

No English title available

Appendix

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

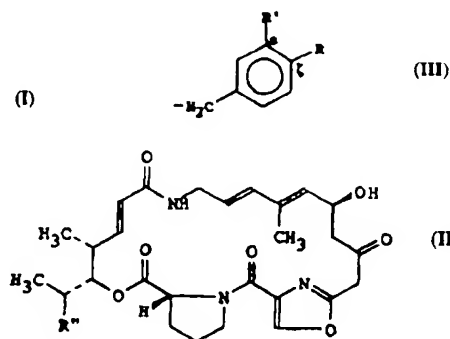
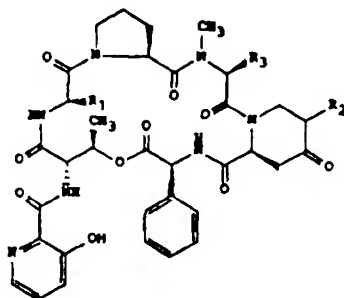
(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 5/078, 7/06, A61K 38/05, 38/08	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/04298	
		(43) Date de publication internationale: 15 février 1996 (15.02.96)	
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01026	(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).		
(22) Date de dépôt international: 31 juillet 1995 (31.07.95)			
(30) Données relatives à la priorité: 94/09564 2 août 1994 (02.08.94) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).	Publiée Avec rapport de recherche internationale.		
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ANGER, Pascal [FR/FR]; 18, rue de l'Eglise, F-91370 Verrières-le-Buisson (FR). BARRIERE, Jean-Claude [FR/FR]; 24, rue Max-Ernst, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). BONNAVAUD, Bertrand [FR/FR]; Bâtiment 1/322, Clos Saint-Vigor, F-78220 Viroflay (FR). LEFEVRE, Patrick [FR/FR]; 1, rue Faie-Félix, F-94300 Vincennes (FR). PARIS, Jean-Marc [FR/FR]; 8, rue des Acacias, F-77360 Vaires-sur-Marne (FR). THIBAUT, Denis [FR/FR]; 28, rue Jean-Colly, F-75013 Paris (FR).			
(74) Mandataire: LOBJOIS, Françoise; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).			

(54) Title: PURIFIED FORM OF STREPTOGRAMINES, PREPARATION OF SAME AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre: FORME PURIFIEE DE STREPTOGRAMINES, SA PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES QUI LA CONTIENNENT

(57) Abstract

Purified form of streptogramins, characterised in that it contains at least one component from group B streptogramins of general formula (I), wherein R_1 is Me or Et, R_2 is H or OH, and R_3 is substituted benzyl of general formula (III), such that 1) if R_2 is H, R is NR_4R_5 , wherein one of R_4 and R_5 is H or an Me radical and the other is Me, and R' is Cl or Br, or R is (C3-5)alkenyl if R_4 and R_5 are Me, or 2) R is H and R' is halogen, alkylamino or dialkylamino, an ether-oxide residue,

[illegible]

of the *Journal of Management Education* and the *Journal of Management Inquiry*.

Country	Year	Population (millions)	Urban population (millions)	Urban population (%)	Population growth rate (%)	Urban population growth rate (%)	Population density (per sq km)	Urban population density (per sq km)
Algeria	1980	10.5	4.5	42.9	1.8	2.5	105	225
Algeria	1985	11.5	5.5	47.8	2.2	3.2	115	275
Algeria	1990	12.5	6.5	52.0	2.6	4.2	125	325
Algeria	1995	13.5	7.5	55.6	3.0	5.0	135	375
Algeria	2000	14.5	8.5	58.6	3.4	5.8	145	425
Algeria	2005	15.5	9.5	61.3	3.8	6.5	155	475
Algeria	2010	16.5	10.5	63.6	4.2	7.2	165	525
Algeria	2015	17.5	11.5	65.7	4.6	8.0	175	575
Algeria	2020	18.5	12.5	67.6	5.0	8.8	185	625
Algeria	2025	19.5	13.5	69.2	5.4	9.6	195	675
Algeria	2030	20.5	14.5	70.7	5.8	10.4	205	725
Algeria	2035	21.5	15.5	72.1	6.2	11.2	215	775
Algeria	2040	22.5	16.5	73.3	6.6	12.0	225	825
Algeria	2045	23.5	17.5	74.5	7.0	12.8	235	875
Algeria	2050	24.5	18.5	75.5	7.4	13.6	245	925
Algeria	2055	25.5	19.5	76.5	7.8	14.4	255	975
Algeria	2060	26.5	20.5	77.4	8.2	15.2	265	1025
Algeria	2065	27.5	21.5	78.2	8.6	16.0	275	1075
Algeria	2070	28.5	22.5	78.9	9.0	16.8	285	1125
Algeria	2075	29.5	23.5	79.7	9.4	17.6	295	1175
Algeria	2080	30.5	24.5	80.3	9.8	18.4	305	1225
Algeria	2085	31.5	25.5	81.0	10.2	19.2	315	1275
Algeria	2090	32.5	26.5	81.6	10.6	20.0	325	1325
Algeria	2095	33.5	27.5	82.1	11.0	20.8	335	1375
Algeria	2100	34.5	28.5	82.6	11.4	21.6	345	1425
Algeria	2105	35.5	29.5	83.1	11.8	22.4	355	1475
Algeria	2110	36.5	30.5	83.6	12.2	23.2	365	1525
Algeria	2115	37.5	31.5	84.0	12.6	24.0	375	1575
Algeria	2120	38.5	32.5	84.4	13.0	24.8	385	1625
Algeria	2125	39.5	33.5	84.8	13.4	25.6	395	1675
Algeria	2130	40.5	34.5	85.2	13.8	26.4	405	1725
Algeria	2135	41.5	35.5	85.6	14.2	27.2	415	1775
Algeria	2140	42.5	36.5	85.9	14.6	28.0	425	1825
Algeria	2145	43.5	37.5	86.2	15.0	28.8	435	1875
Algeria	2150	44.5	38.5	86.5	15.4	29.6	445	1925
Algeria	2155	45.5	39.5	86.8	15.8	30.4	455	1975
Algeria	2160	46.5	40.5	87.1	16.2	31.2	465	2025
Algeria	2165	47.5	41.5	87.4	16.6	32.0	475	2075
Algeria	2170	48.5	42.5	87.7	17.0	32.8	485	2125
Algeria	2175	49.5	43.5	88.0	17.4	33.6	495	2175
Algeria	2180	50.5	44.5	88.3	17.8	34.4	505	2225
Algeria	2185	51.5	45.5	88.5	18.2	35.2	515	2275
Algeria	2190	52.5	46.5	88				

[illegible]

(57) Abrégé

Forme purifiée de streptogramines caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une composante du groupe B des streptogramines de formule générale (I) dans laquelle R₁ est Me ou Et, R₂ est H ou OH, et R₃ est benzyle substitué de formule générale (III) pour lequel 1) si R₂ est H, R est NR₄R₅ pour lequel R₄ et R₅ sont l'un H ou un radical Me et l'autre Me et R' est Cl ou Br, ou R est alcényle (3 à 5C) si R₄ et R₅ sont Me, ou bien 2) R est H et R' est halogène, alcoylamino ou dialcoylamino, un reste éther-oxyde, alcoylthio, alcoyle (1 à 3C) ou trihalogénométhyle, ou R est halogène, alcoylamino (2 à 4C), dialcoylamino (2 à 4C) ou méthyl éthyl amino, pyrrolidino, alcényl alcoyl amino, dialcénylamino, un radical alcoyl cycloalcoylméthyl amino, ou bien un reste éther-oxyde, alcoylthio, alcoylthiométhyle, alcoyle (1 à 6C), aryle ou trihalogénométhyle, et R' est H ou bien R est d'halogène, amino, alcoylamino ou dialcoylamino, un reste éther-oxyde, un radical alcoylthio, alcoyle (1 à 6C) ou trihalogénométhyle et R' est halogène, alcoylamino ou dialcoylamino, un reste éther-oxyde ou alcoylthio, alcoyle (1 à 3C), cocrystallisée avec au moins une composante "minoritaire" du groupe A de formule générale (II) dans laquelle R" est H, Me ou Et.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire de Corée	SD	Soudan
CH	Suisse	KW	Koweït	SG	Singapour
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenie
CM	Cameroun	LA	Laos	SK	Slovaquie
CN	Chine	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CS	Tchécoslovaquie	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	LV	Lettonie	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MC	Monaco	TT	Trinité-et-Tobago
ES	Espagne	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
FI	Finlande	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	ML	Mali	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon	MN	Mongolie	VN	Viet Nam

FORME PURIFIEE DE STREPTOGRAMINES, SA PREPARATION ET LES
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES QUI LA CONTIENNENT

La présente invention concerne une forme purifiée de streptogramines comprenant au moins une composante du groupe B des streptogramines
5 définie ci-après par la formule générale (I) cocrystallisée avec au moins une composante "minoritaire" du groupe A définie ci-après par la formule générale (II).

Parmi les streptogramines connues, la pristinamycine (RP 7293), antibactérien d'origine naturelle produit par *Streptomyces pristinaespiralis* a été isolée pour la première fois en 1955. La pristinamycine
10 commercialisée sous le nom de Pyostacine[®] est constituée principalement de pristinamycine IA et de pristinamycine IIA.

Un autre antibactérien de la classe des streptogramines : la virginiamycine, a été préparé à partir de *Streptomyces virginiae*,
15 ATCC 13161 [Antibiotics and Chemotherapy, 5, 632 (1955)]. La virginiamycine (Staphylomycine[®]) est constituée principalement de facteur S et de facteur M₁.

Dans le brevet US 3 325 359 ont été décrites des compositions pharmaceutiques comprenant des substances antibiotiques constituant
20 l'antibiotique 899 : facteur S et facteur M₁.

Les antibactériens d'origine naturelle, de la classe des streptogramines sont constitués du mélange de 2 groupes de composants : composantes du groupe B et composantes du groupe A, chaque groupe ayant une activité antibactérienne propre. Il a été démontré que
25 l'association formée par les 2 groupes des composantes provoque une synergie d'action qui résulte dans une activité bactériostatique et

Formelstreptogramin A1. Modellsysteme für die Entwicklung von Membranen, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August Universität
30 Göttingen, Göttingen 1979. 136 Seiten, 111 Abbildungen.

dans Antibiotics of the virginiamycin family, Inhibitors which contain synergistic components, C. Cocito, Microbiological Reviews, 145-98 (1979) ont été décrites des composantes des groupes A et B des streptogramines. J. Preud'Homme, P. Tarridec, et A. Belloc, Bull. Soc. Chim. Fr., 2, 585 (1968) ont également décrit la pristinamycine naturelle ainsi que les différentes composantes qui la constituent.

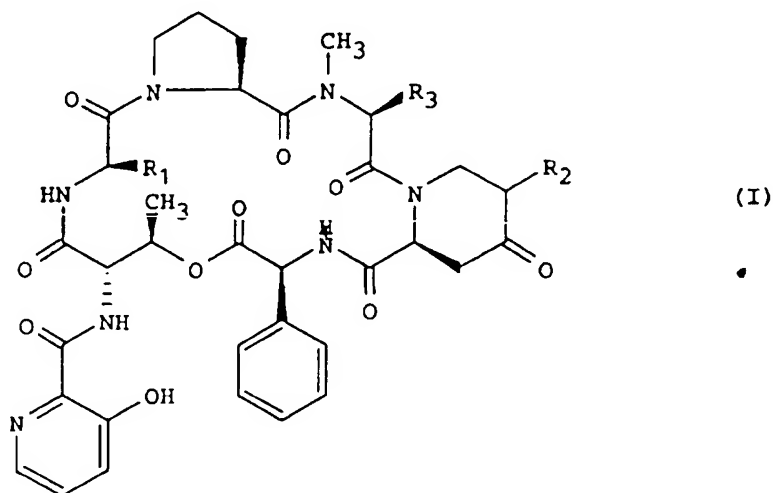
En ce qui concerne la préparation industrielle de produits de cette classe, jusqu'à présent les techniques à disposition n'avaient pas permis d'obtenir, à une échelle préparative, une forme suffisamment purifiée et la production de lots de qualité suffisamment constante et reproductible pour répondre aux exigences des législations de certains pays en matière d'enregistrement.

Dans le domaine des antibactériens, il est bien connu des praticiens que des allergies ou des résistances peuvent se développer après administration de certaines classes d'antibiotiques [The New England Journal of Medicine, 324 (9), 601 (1991)]. En milieu hospitalier on connaît notamment de nombreuses souches résistantes de Staphylococcus aureus. C'est pourquoi il est extrêmement utile pour le médecin d'avoir à sa disposition un large éventail de classes chimiquement différentes de manière à pouvoir adapter le traitement au cas particulier du malade à traiter. La conséquence de l'absence de commercialisation d'une classe déterminée peut être très grave, voire dramatique puisqu'elle peut résulter dans la privation de traitement chez des malades ne tolérant pas les autres classes d'antibiotiques.

Ainsi, les essais de purification mis en oeuvre avaient toujours eu pour but d'éliminer les composantes minoritaires des streptogramines, celles-ci étant considérées comme non indispensables et plutôt comme des impuretés.

La proportion en poids est inférieure à 10 % dans la pristinamycine naturelle, et le plus souvent de l'ordre de 8 % ou même de l'ordre de 4 % dans la virginiamycine.

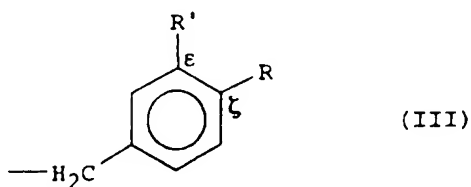
Il a été trouvé maintenant, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, que l'association constituée d'une ou plusieurs composantes du groupe B, de formule générale :



5 dans laquelle

- le symbole R_1 représente un radical méthyle ou éthyle,
- le symbole R_2 représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy, et
- le symbole R_3 représente un radical benzyle substitué de formule

10 générale :



dans laquelle

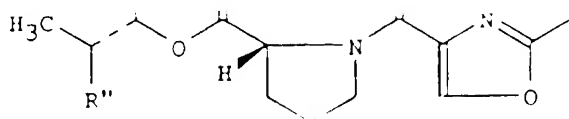
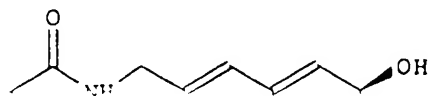
soit R' et E sont simultanément hydrogène, R représente un atome de chlore ou de brome, ou représente un radical alcényle contenant 3 à 5 atomes de carbone si R_4 et R_5 sont des radicaux méthyle, ou bien

2) R est un atome d'hydrogène et R' représente un atome d'halogène, un radical alcoylamino ou dialcoylamino, le reste d'un éther-oxyde, un radical alcoylthio, alcoyle contenant 1 à 3 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou trihalogénométhyle, ou bien

- 5 R est un atome d'halogène, un radical alcoylamino contenant 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, dialcoylamino dont les parties alcoyle sont identiques ou différentes et contiennent 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou méthyl éthyl amino, un radical pyrrolidino, un radical alcényl alcoyl amino dont
 10 la partie alcényle contient 3 ou 4 atomes de carbone et la partie alcoyle est définie comme ci-dessus, un radical dialcénylamino dont les parties alcényle sont définies comme ci-dessus, un radical alcoyl cycloalcoylméthyl amino dont la partie alcoyle est définie comme ci-dessus et la partie cycloalcoyle contient 3 ou 4 atomes de
 15 carbone, le reste d'un éther-oxyde, un radical alcoylthio, un radical alcoylthiométhyle, alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, aryle ou trihalogénométhyle, et R' est un atome d'hydrogène, ou bien

R est un atome d'halogène, un radical amino, alcoylamino ou
 20 dialcoylamino, le reste d'un éther-oxyde, un radical alcoylthio, alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou trihalogénométhyle et R' représente un atome d'halogène, un radical alcoylamino ou dialcoylamino, le reste d'un éther-oxyde ou un radical alcoylthio ou alcoyle contenant 1 à 3 atomes de carbone en
 25 chaîne droite ou ramifiée,

et d'une ou plusieurs composantes "minoritaires" du groupe A des streptogramines, de formule générale :



dans laquelle R'' est un atome d'hydrogène ou un radical méthyle ou éthyle, est particulièrement intéressante du fait de son activité biologique in vivo.

Dans la formule générale (I), lorsque R ou R' (dans R₃) représente un atome d'halogène, il s'agit de préférence d'un atome de fluor, sauf si R' est l'atome d'hydrogène, dans ce cas R est indifféremment chlore, brome, fluor ou iode ; lorsque R' représente un radical alcoylamino ou dialcoylamino, les radicaux alcoyle sont de préférence choisis parmi méthyle ou éthyle ; lorsque R ou R' représente le reste d'un éther-oxyde, il peut être représenté par un reste OR° pour lequel R° est choisi de préférence parmi les groupements méthyle, éthyle éventuellement substitué par un atome de chlore, allyle ou trifluorométhyle ; lorsque R ou R' représente un radical alcoylthio il s'agit de préférence du radical méthylthio ; lorsque R représente un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, il représente de préférence méthyle, isopropyle ou tert-butyle ; lorsque R représente un radical aryle il s'agit de préférence d'un radical phényle ; lorsque R ou R' représente un radical trihalogénométhyle il s'agit de préférence du radical trifluorométhyle. Par ailleurs il est entendu que, sauf mention spéciale, les radicaux alcoyle sont droits ou ramifiés et contiennent 1 à 4 atomes de carbone.

Le produit de formule générale (II) pour lequel R'' est un radical éthyle ci-après appelé pristinamycine IIF (PIIF) et le produit de formule générale (II) pour lequel R'' est un atome d'hydrogène ci-après appelé pristinamycine IIG (PIIG) sont des produits qui constituent des composantes très minoritaires des streptogramines dont la proportion en poids est inférieure à 0,5 % dans les lots de produit naturel.

composantes... formule générale II... stoechiométrie correspondant à la proportion relative d'environ 43-49/57-51 en poids].

Selon l'invention les associations cocristallisées sont préparées de la manière suivante : un mélange brut contenant au moins 30 % d'une composante minoritaire du groupe A répondant à la formule générale (II) mis en solution dans un solvant organique tel qu'une cétone (acétone, méthyléthylcétone, méthylisobutylcétone par exemple), un ester (acétate d'éthyle, acétate d'isopropyle, acétate de butyle, acétate d'isobutyle par exemple), un solvant chloré (chlorure de méthylène, chloroforme, dichloro-1,2 éthane par exemple), ou un nitrile (acétonitrile par exemple), est additionné d'une composante du groupe B définie par la formule générale (I) pour donner un composé cocristallisé dans les proportions définies ci-avant. Il est entendu que la quantité de composé de formule générale (I) introduite est choisie convenablement pour que la concentration résiduelle de ce produit (après la cocristallisation) soit inférieure à sa solubilité dans le milieu. Il est également entendu que des variations dans les teneurs respectives du milieu initial en produit de formule générale (II) et en produit de formule générale (I) n'entraînent pas de modification du composé cocristallisé obtenu.

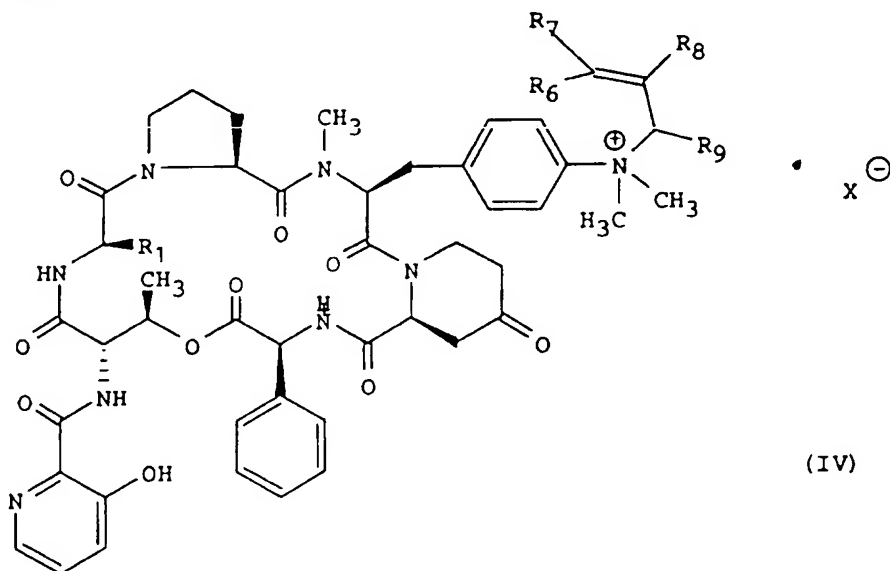
Cette association cocristallisée présente l'avantage d'une très bonne stabilité et d'une pureté élevée.

La préparation des composantes du groupe B des streptogramines définies par la formule générale (I) peut être effectuée de la manière suivante :

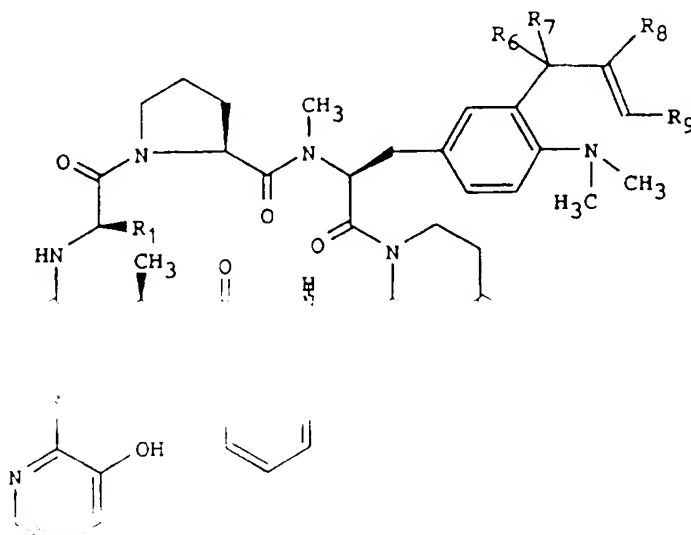
Lorsque R_3 représente un radical de formule générale (III) pour lequel R et R' sont définis comme en 1), si R' est un atome de chlore ou de brome les produits de formule générale (I) peuvent être obtenus par action du dérivé N-halogéno succinimide correspondant sur la pristinamycine I pour laquelle R' est un atome d'hydrogène.

(dichlorométhane, dichloréthane, chloroforme) ou un nitrile (acétonitrile), à une température comprise entre 20 et 80°C.

Lorsque R_3 représente un radical de formule générale (III) pour lequel R et R' sont définis comme en 1), si R' est un radical alcényle contenant 3 à 5 atomes de carbone les produits de formule générale (I) peuvent être obtenus par réarrangement en milieu
 5 légèrement basique d'un sel dérivé de 4-N-alcénylammonio pristinamycine IA de formule générale :



dans laquelle R_1 est défini comme ci-dessus, R_6 , R_7 , R_8 et R_9 sont un atome d'hydrogène ou un radical méthyle, pourvu que 2 d'entre eux au
 10 moins soient des atomes d'hydrogène et X^\ominus représente un anion, pour donner le dérivé de formule générale :

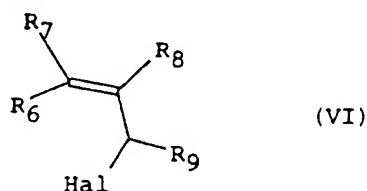


pour lequel R_1 , R_6 , R_7 , R_8 et R_9 sont définis comme ci-dessus.

La réaction s'effectue par chauffage à une température comprise entre 80 et 100°C en milieu aqueux ou biphasique (par exemple en milieu acétate d'éthyle/eau), en présence d'acétate de sodium ou de bicarbonate de sodium ou de potassium. On utilise avantageusement un halo-

5 génure de 4-N-alcénylammonio pristinamycine IA.

L'halogénure de 4-N-alcénylammonio pristinamycine IA peut être obtenu par action d'un halogénure d'alcényle de formule générale :



10 pour lequel R_6 , R_7 , R_8 et R_9 sont définis comme ci-dessus, et Hal représente un atome d'halogène, sur un dérivé de la pristinamycine de formule générale :

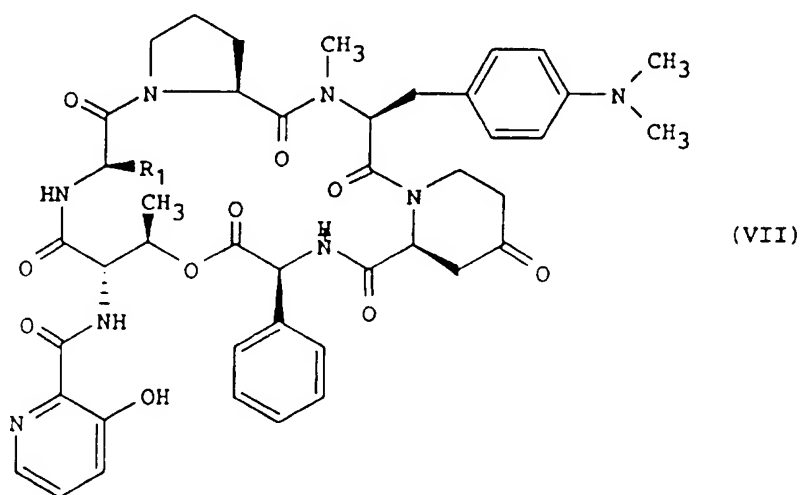


Fig. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.

qu'un solvant chloré (dichlorométhane, dichloréthane, chloroforme par exemple) ou un alcool (éthanol par exemple) ou dans un mélange, à une température comprise entre 20°C et la température de reflux.

mélange réactionnel. De préférence on fait agir un produit de formule générale (VI) pour lequel Hal est un atome de chlore ou de brome.

Lorsque R_3 représente un radical de formule générale (III) pour lequel R et R' sont définis comme en 2), les produits de formule
5 générale (I) peuvent être obtenus comme décrit ci-après dans les exemples, à partir d'une souche d'un microorganisme producteur de streptogramines possédant au moins une modification génétique affectant la biosynthèse d'un précurseur des streptogramines du groupe B, ladite souche mutante cultivée dans un milieu de culture
10 adéquat, complémenté avec au moins un précurseur original autre que celui dont la biosynthèse est altérée (et correspondant à la structure souhaitée), produit les dérivés de streptogramines attendus.

Les souches mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention
15 sont donc des souches productrices de streptogramines naturelles (pristinamycine IA, pristinamycine IB, . virginiamycine S), mutées. La/lesdites modifications génétiques peuvent être localisées soit au niveau d'un des gènes impliqués dans la biosynthèse desdits précurseurs soit en dehors de la région codante, par exemple dans les
20 régions responsables de l'expression et/ou de la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle desdits gènes ou dans une région appartenant au transcript contenant lesdits gènes.

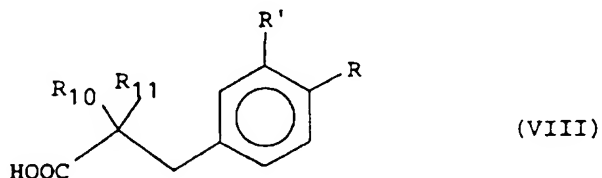
Notamment, les souches mutantes possèdent une ou plusieurs modifications génétiques au niveau d'au moins un de leurs gènes impliqués
25 dans la biosynthèse des précurseurs des streptogramines du groupe B. Cette ou ces modifications génétiques altèrent l'expression dudit gène c'est à dire rendent ce gène, et le cas échéant un autre des gènes impliqués dans la biosynthèse des précurseurs, partiellement ou

Les gènes, susceptibles d'être mutés sont de préférence les gènes impliqués dans la biosynthèse du précurseur 4-diméthylamino-L-phénylalanine (MPAPA). Il s'agit plus préférentiellement des gènes

papA, papM, papB (SEQ ID N°3), papC (SEQ ID N°2). Les gènes papA et papM ont déjà été décrits dans la demande de brevet PCT/FR93/0923.

En complétant le milieu de culture de souches mutantes selon l'invention, avec au moins un précurseur original, il s'avère possible d'orienter la biosynthèse vers les nouvelles streptogramines de formule générale (I).

Les précurseurs mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention sont des dérivés de la phénylalanine ainsi que des dérivés d'acides α -cétocarboxyliques qui peuvent être représentés par la formule générale:



dans laquelle R et R' sont définis comme précédemment en 2) et R₁₀ est un atome d'hydrogène et R₁₁ est un radical amino, ou bien R₁₀ et R₁₁ forment ensemble un radical oxo.

A titre de précurseurs convenant à l'invention, on peut notamment citer les suivants:

4-diéthylaminophénylalanine, 4-éthylaminophénylalanine, 4-méthylthiophénylalanine, 4-méthylphénylalanine, 4-méthoxyphénylalanine, 4-trifluorométhoxyphénylalanine, 4-chlorophénylalanine, 4-bromophénylalanine, 4-iodophénylalanine, 4-trifluorométhylphénylalanine, 4-tert-butylphénylalanine, 4-isopropylphénylalanine, 3-méthylaminophénylalanine, 3-méthoxyphénylalanine, 3-méthylthiophénylalanine, 3-fluorophénylalanine, acide 4-tert-butylphénylpyruvique, 4-fluorophénylalanine, 3-éthoxyphénylalanine, 3,4-diméthylphénylalanine, 3-méthyl-

La préparation et la séparation des composantes des streptogramines naturelles des groupes A [streptogramines de formule générale (II)] et B [streptogramines de formule générale (III)] sont

effectuée par fermentation et isolement des constituants à partir du mout de fermentation selon ou par analogie avec la méthode décrite par J. Preud'homme et coll., Bull. Soc. Chim. Fr., vol.2, 585 (1968), dans Antibiot. & Chemother., 5, 632 (1955) ou 7, 606 (1957), dans 5 Chromatog. Sym., 2° Bruxelles, 181 (1962), dans Antibiot. Ann., 728 784 (1954-55), dans le brevet US 3 299 047 ou dans Streptogramine als Modellsysteme für den Kationentransport durch Membranen, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Facultät der Georg-August Universität zu Göttingen, Göttingen 10 1979 ou comme décrit ci-après dans les exemples. Notamment dans le cas des pristinaamycines, la séparation des composantes des groupes A et B est effectuée par mise en suspension de la streptogramine brute dans un solvant organique comme un acétate (acétate d'éthyle par exemple) suivie de la filtration ou de la centrifugation de la 15 composante brute du groupe A, et de l'extraction de la composante du groupe B en milieu acide aqueux suivie d'une réextraction en milieu chlorométhylénique. La séparation des composantes des groupes A et B peut également être effectuée par extraction acide d'une solution de streptogramine brute dans la méthylisobutylcétone, puis isolement par 20 extraction de la composante du groupe B à partir de la phase aqueuse et isolement de la composante du groupe A par précipitation à partir de la phase organique.

Après séparation, la purification des composantes du groupe B des streptogramines peut être mise en oeuvre par cristallisation dans un 25 alcool tel que l'éthanol, le méthanol ou l'isopropanol, dans un acétate (acétate d'isopropyle ou acétate de butyle par exemple), dans une cétone (méthyléthylcétone par exemple) ou dans l'acétonitrile ou par chromatographie. La purification des composantes du groupe A de formule générale (II) peut être effectuée par chromatographie en 30 éluant par un mélange acétonitrile-eau.

A et B respectivement de formule générale (II) et notamment de formule générale (VII) est effectuée comme décrit dans la demande de brevet français 2 689 518, par fermentation séparée.

Ainsi, selon l'invention il est maintenant possible d'obtenir une nouvelle forme purifiée et cristallisée de streptogramine dont le taux d'impuretés, la définition et la constance de la composition sont améliorés et qui possède de surcroît une activité in vivo
5 améliorée ainsi qu'une faible toxicité. La nouvelle association cocrystallisée pourra ainsi pallier à l'absence de traitement par un antibactérien de cette classe dans de nombreux pays.

Les associations selon l'invention manifestent une action biologique in vivo supérieure à celle des associations de streptogramines,
10 jusqu'à présent connues, sous forme de mélange de poudres.

La nouvelle association cocrystallisée d'une composante du groupe B des streptogramines de formule générale (I) et d'une composante du groupe A des streptogramines de formule générale (II) présente une activité in vivo particulièrement intéressante notamment sur les
15 germes à Gram-positif. In vivo, chez la souris elle s'est montrée active sur *Staphylococcus aureus* IP 8203 à des doses de 25 à 50 mg/kg par voie orale.

De plus la nouvelle association ne présente pas de toxicité : aucun signe de toxicité ne se manifeste chez la souris à la dose de
20 150 mg/kg par voie orale (2 administrations).

L'association cocrystallisée selon l'invention peut être également utilisée comme moyen de purification d'une composante minoritaire des streptogramines répondant à la formule générale (II).

En effet, il n'a jamais été possible de purifier une composante du
25 groupe A de formule générale (II) par cristallisation.

Il a maintenant été montré que la composante du groupe A de formule

Selon l'invention, lorsque l'association cocrystallisée est utilisée
30 comme moyen de purification de la composante de formule générale (II), celle-ci peut être obtenue par extraction avec l'eau.

du composé cocristallisé dans une cétone (méthylisobutylcétone par exemple), puis isolement de la composante du groupe A par précipitation à partir de la phase organique, lorsque R ou R' représentent alcoylamino ou dialcoylamino ; ou alternativement par chromatographie liquide haute performance.

D'un intérêt particulier sont les associations cocristallisées qui comprennent au moins une composante du groupe B des streptogramines définie par la formule générale (I), dans laquelle les symboles R_1 et R_2 sont définis comme précédemment, et le symbole R_3 représente un radical benzyle substitué de formule générale (III) dans laquelle

1) à condition que R_2 soit simultanément hydrogène, R représente NR_4R_5 pour lequel les symboles R_4 et R_5 sont l'un un atome d'hydrogène ou un radical méthyle et l'autre un radical méthyle et R' est un atome de chlore ou de brome, ou représente un radical alcényle contenant 3 à 5 atomes de carbone si R_4 et R_5 sont des radicaux méthyle, ou bien

2) R est un atome d'hydrogène et R' représente un radical alcoylamino ou dialcoylamino, le reste d'un éther-oxyde ou un radical alcoylthio, ou bien

20 R est un radical alcoylamino contenant 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, dialcoylamino dont les parties alcoyle sont identiques ou différentes et contiennent 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou méthyl éthyl amino, un radical pyrrolidino, un radical alcényl alcoyl amino dont la partie alcényle
25 contient 3 ou 4 atomes de carbone et la partie alcoyle est définie comme ci-dessus, le reste d'un éther-oxyde, un radical alcoylthio, alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou trihalogénométhyle et R' représente un atome d'halogène,

ou bien un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée et R' représente un atome d'halogène,

cocristallisée avec au moins une composante "minoritaire" du groupe A des streptogramines telle que définie précédemment, étant entendu que, sauf mention spéciale, les radicaux alcoyle sont droits ou ramifiés et contiennent 1 à 4 atomes de carbone.

5 Et parmi ces produits, les associations préférées sont les associations cocristallisées qui comprennent au moins une composante du groupe B des streptogramines définie par la formule générale (I), dans laquelle le symbole R_1 est un radical éthyle, le symbole R_2 est un atome d'hydrogène, et

10 le symbole R_3 représente un radical benzyle substitué de formule générale (III) dans laquelle :

1) à condition que R_2 soit simultanément hydrogène, R représente NR_4R_5 pour lequel les symboles R_4 et R_5 sont l'un un atome d'hydrogène ou un radical méthyle et l'autre un radical méthyle et R'
15 est un atome de chlore ou de brome, ou représente un radical allyle si R_4 et R_5 sont des radicaux méthyle, ou bien

2) R est un atome d'hydrogène et R' représente un radical alcoylamino ou dialcoylamino, un radical méthoxy, éthoxy, allyloxy ou trifluorométhoxy, ou un radical alcoylthio, ou bien

20 R est un radical alcoylamino contenant 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, dialcoylamino dont les parties alcoyle sont identiques ou différentes et contiennent 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou méthyl éthyl amino, un radical pyrrolidino, un radical allyl alcoyl amino dont la partie alcoyle est
25 définie comme ci-dessus, un radical méthoxy, éthoxy, allyloxy ou trifluorométhoxy, un radical alcoylthio, alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou trifluorométhyle,

30 R est un radical alcoylamino contenant 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée et R' représente un atome d'halogène,

cocristallisée avec au moins une composante "minoritaire" du groupe A des streptogramines telle que définie précédemment, étant entendu que, sauf mention spéciale, les radicaux alcoyle sont droits ou ramifiés et contiennent 1 à 4 atomes de carbone.

- 5 Les exemples suivants donnés à titre non limitatif illustrent la présente invention.

Dans les exemples qui suivent il est entendu que les titres sont donnés en % en poids. Les chromatographies analytiques (CLHP) ont été réalisées en mode isocratique à 0,8 ml/mn avec un éluant^e composé de
10 40 % d'acétonitrile et de 60 % de tampon phosphate 0,1M pH=2,9 sur une colonne de Nucléosil 100 C8[®] en 5 μ (4x133 mm, Macherey Nagel). Les streptogramines sont détectées et dosées d'après leur absorbance U.V. à 206 nm. Les titres présentés ont été normalisés à 100 %. Les diagrammes de diffraction X sont effectués sur diffractomètre
15 Phillips PW1700[®] à anticathode de cobalt. La référence 100 est donnée pour la raie à 15,8 Å. Les valeurs relatives sont estimées par la mesure de la hauteur de la raie, fond continu déduit. Dans les exemples qui suivent, le spectre de diffraction X du produit cocristallisé est différent du spectre de la composante du groupe B
20 cristallisée seule dans le même solvant, lorsqu'elle existe sous forme cristallisée.

PREPARATION D'UN PRODUIT COCRISTALLISÉ :

Exemple 1

A une solution de 784 mg de pristinamycine IIB dans 7 cm³ d'acétone,
25 on ajoute 672 mg de 4 ϵ -bromo pristinamycine I_A. Après tiédissement pour faciliter le passage en solution puis retour à 20°C, on observe une précipitation. Après 20 heures d'agitation à 20°C, le produit est

30 cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4 ϵ -bromo pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 188°C, titrant environ 53 % en pristinamycine IIB et 44 % en 4 ϵ -bromo pristinamycine I_A.

Diagramme de diffraction X :

Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	36
5,9	54
5,2	68
5,0	39

5 Exemple 2

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 112 mg de pristinamycine IIB et 96 mg de 4 ϵ -chloro pristinamycine IA dans 1 cm³ d'acétone, on obtient ainsi 130 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une
 10 molécule de 4 ϵ -chloro pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 190°C, titrant environ 55 % en pristinamycine IIB et 45 % en 4 ϵ -chloro pristinamycine I_A.

Diagramme de diffraction X :

15 Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	55
5,9	43

Exemple 3

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 112 mg de pristinamycine IIB et 96 mg de 4ε-allyl pristinamycine I_A dans 1 cm³ d'acétone, on obtient 160 mg de l'association

5 cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4ε-allyl pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 182°C, titrant environ 53 % en pristinamycine IIB et 47 % en 4ε-allyl pristinamycine I_A.

Diagramme de diffraction X :

10 Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,6	80
10,6	100
6,6	37
4,6	63

Exemple 4

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant

15 560 mg de pristinamycine IIB et 480 mg de 4ε-bromo pristinamycine I_B dans 5 cm³ d'acétone, on obtient 730 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4ε-bromo pristinamycine I_B sous forme de cristaux blancs fondant à 179°C titrant environ 53 % en pristinamycine IIB et 47 % en

20 4ε-bromo pristinamycine I_B.

raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	47
5,9	53
5,2	66
5,0	39

Exemple 5

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 784 mg de pristinamycine IIB et 672 mg de 4ε-chloro pristinamycine I_B dans 7 cm³ d'acétone, on obtient 1,0 g de l'association cocrystallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4ε-chloro pristinamycine I_B sous forme de cristaux blancs fondant à 178°C titrant environ 57 % en pristinamycine IIB et 43 % en 4ε-chloro pristinamycine I_B.

10 Diagramme de diffraction X :

Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	62
5,9	43
5,2	60
5,0	43

Exemple 6

420 mg de pristinamycine IIB et 264 mg de dés(4N-diméthylamino) 4ζ-tertiobutyl pristinamycine IA dans 3,8 cm³ d'acétone, on obtient 305 mg de l'association cocrystallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de dés(4N-diméthylamino) 4ζ-tertiobutyl pristinamycine IA.

pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 170°C, titrant environ 57 % en pristinamycine IIB et 43 % en dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-tertiobutyl pristinamycine I_A.

Diagramme de diffraction X :

- 5 Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	68
5,9	39
5,2	66
5,0	46

Exemple 7

- En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant
 10 168 mg de pristinamycine IIB et 144 mg de dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-isopropyl pristinamycine I_A dans 1,5 cm³ d'acétone, on obtient 270 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-isopropyl pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 180°C, titrant
 15 environ 56 % en pristinamycine IIB et 44 % en dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-isopropyl pristinamycine I_A.

Diagramme de diffraction X :

Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

20

distance interréticulaire (Å)	
5,9	65
5,2	81

Exemple 8

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 224 mg de pristinamycine IIB et 192 mg de dés(4N-diméthylamino) 4ζ-méthoxy pristinamycine I_A dans 2 cm³ d'acétone, on obtient 320 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-méthoxy pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 169°C, titrant environ 54 % en pristinamycine IIB et 46 % en dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-méthoxy pristinamycine I_A.

10 Diagramme de diffraction X :

Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	72
5,9	63
5,2	72
5,0	50

Exemple 9

15 En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 149 mg de pristinamycine IIB et 128 mg de dés(4N-diméthylamino) 4ζ-méthyl pristinamycine I_A dans 1,3 cm³ d'acétone, on obtient 205 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-méthyl pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs, titrant environ 56 % en pristinamycine

Exemple 10

A une solution de 1,94 g de pristinamycine IIB dans 6 cm³ d'acétone on ajoute une solution de 1,6 g de dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-méthylthio pristinamycine I_A dans 6 cm³ d'acétone. Le mélange est évaporé

30 minutes puis filtré. Les cristaux obtenus sont rincés par 5 fois 1 cm³ d'acétone puis par 3 fois 10 cm³ de pentane puis séché à poids constant sous pression réduite (2,7 kPa). On obtient ainsi 2,3 g de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-méthythio pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 183°C, titrant environ 51 % en pristinamycine IIB et 49 % en dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-méthythio pristinamycine I_A.

Diagramme de diffraction X :

- 10 Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	47
5,9	61
5,2	84
5,0	59

Exemple 11

- En opérant comme à l'exemple 10 mais à partir de 106 mg de pristinamycine IIB et de 86 mg de dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-méthylamino pristinamycine I_A et après 18 heures d'agitation, on obtient 41 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-méthylamino pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs titrant environ 53 % en pristinamycine IIB et 47 % en dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-méthylamino pristinamycine I_A.

Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	31
5,9	31
5,2	41
5,0	30

Exemple 12

En opérant comme à l'exemple 10 mais à partir de 57 mg de pristinamycine IIB et de 48 mg de dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-trifluorométhyl pristinamycine I_A et après 17 heures d'agitation, on obtient 5 62 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-trifluorométhyl pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 183°C, titrant environ 55 % en pristinamycine IIB et 45 % en dés(4ζ-diméthylamino) 4ζ-trifluorométhyl pristinamycine I_A.

10 Exemple 13

En opérant comme à l'exemple 10 mais à partir de 370 mg de pristinamycine IIB et de 300 mg de dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-méthoxy pristinamycine I_A et après 17 heures d'agitation, on obtient 330 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB 15 et de une molécule de dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-méthoxy pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 180°C, titrant environ 48 % en pristinamycine IIB et 52 % en dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-méthoxy pristinamycine I_A.

Diagramme de diffraction X :

distance interréticulaire (Å)	
15,5	52
10,5	62
9,7	100
5,2	42
4,7	52

Exemple 14

En opérant comme à l'exemple 10 mais à partir de 70 mg de pristinamycine IIB et de 75 mg de dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-fluoro 4ζ-méthyl pristinamycine I_A (titrant 75 %) et après 3 heures 45 minutes d'agitation, on obtient 57 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-fluoro 4ζ-méthyl pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 184°C, titrant environ 53 % en pristinamycine IIB et 47 % en dés(4ζ-diméthylamino) 4ε-fluoro 4ζ-méthyl pristinamycine I_A.

Diagramme de diffraction X :

Dans le tableau ci-après sont données les intensités relatives des raies principales.

15

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,3	71
5,9	54

5,0	50
-----	----

Exemple 15

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 61 mg de pristinamycine IIB et 50 mg de 4E-éthoxy-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A dans 0,6 cm³ d'acétone, on obtient 5 30 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4E-éthoxy-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 182°C, titrant 59 % en pristinamycine IIB et 41 % en 4E-éthoxy-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A.

10 Diagramme de diffraction X :

Dans le tableau ci-dessous sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,5	32
9,9	100
5,3	59
4,7	47
3,5	36

Exemple 16

15 En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 97 mg de pristinamycine IIB et 80 mg de 4Z-éthoxy-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A dans 0,7 cm³ d'acétone, on obtient 100 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et d'une molécule de 4Z-éthoxy-dés(4Z-diméthylamino) 20 pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 196°C,

Exemple 17

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 56 mg de pristinamycine IIB et 47 mg de 4 ζ -allyloxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A dans 0,5 cm³ d'acétone, on obtient
5 ainsi 67 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4 ζ -allyloxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 196°C, titrant 57,1 % en pristinamycine IIB et 42,9 % en 4 ζ -allyloxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

10 Exemple 18

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 62 mg de pristinamycine IIB et 53 mg de 4 ζ -éthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A dans 0,6 cm³ d'acétone, on obtient
15 47 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4 ζ -éthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 188°C, titrant 55,7 % en pristinamycine IIB et 44,3 % en 4 ζ -éthylamino-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Exemple 19

20 En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 178 mg de pristinamycine IIB et 153 mg de 4 ζ -trifluorométhoxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A dans 1,8 cm³ d'acétone, on obtient 188 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4 ζ -trifluorométhoxy-dés(4 ζ -
25 diméthylamino) pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 184°C, titrant 54,1 % en pristinamycine IIB et 45,9 % en 4 ζ -trifluorométhoxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

30 raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,7	71
5,9	52,4
5,2	100
5	73
4,7	41,1

Exemple 20

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 61 mg de pristinamycine IIB et 50 mg de 4E-méthylthio-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A dans 0,6 cm³ d'acétone, on obtient
 5 ainsi 38 mg de l'association cocrystallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4E-méthylthio-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 188°C, titrant 53,1 % en pristinamycine IIB et 46,9 % en 4E-méthylthio-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A.

10 Diagramme de diffraction X :

Dans le tableau ci-dessous sont données les intensités relatives des raies principales.

distance interréticulaire (Å)	
15,8	100
10,4	38

distance interréticulaire (Å)	
5,9	53

15 Exemple 21

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple 1 mais en engageant 61 mg de pristinamycine IIB et 50 mg de 4E-méthylthio-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A dans 0,6 cm³ d'acétone, on obtient 38 mg de l'association cocrystallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4E-méthylthio-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 188°C, titrant 53,1 % en pristinamycine IIB et 46,9 % en 4E-méthylthio-dés(4Z-diméthylamino) pristinamycine I_A.

dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A dans 0,3 cm³ d'acétone, on obtient ainsi 30 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4ζ-(allyl éthyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 174°C, titrant 52,3 % en pristinamycine IIB et 47,7 % en 4ζ-(allyl éthyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

Exemple 22

En opérant comme décrit ci-dessus à l'exemple i mais en engageant 42 mg de pristinamycine IIB et 36 mg de 4ζ-(éthyl propyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A dans 0,5 cm³ d'acétone, on obtient 16 mg de l'association cocristallisée de 2 molécules de pristinamycine IIB et de une molécule de 4ζ-(éthyl propyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 193°C, titrant 51 % en pristinamycine IIB et 49 % en 4ζ-(éthyl propyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

PREPARATION DES COMPOSANTES DU GROUPE B :

Exemple A

4ε-chloro pristinamycine I_A.

On place dans un ballon 8 g de pristinamycine IA dans 80 cm³ d'acétonitrile puis on ajoute 1,39 g de N-chlorosuccinimide. Le mélange est chauffé au reflux pendant 16 heures 30 minutes puis on ajoute 0,12 g de N-chlorosuccinimide et on poursuit le reflux 3 heures. Le mélange réactionnel est concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 30°C. Le solide obtenu est repris par 50 cm³ de dichlorométhane et 60 cm³ d'eau distillée additionnée de chlorure de sodium, la phase aqueuse est décantée puis la phase organique lavée

un solide jaune qui est recristallisé dans 100 cm³ de propanol-1 au reflux puis une deuxième fois dans 50 cm³ de propanol-1 au reflux.

pression réduite (135 Pa) à 50°C on obtient 3g de 4ε-chloro pristinamycine I_A sous forme de cristaux beige clair fondant à 220°C.

Spectre de R.M.N. du proton (300 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 0,58 (dd, J=16 et 6 Hz, 1H, 5 β₂), 0,91 (t, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1,05 à 1,35 (mt, 2H: 3 β₂ et 3 γ₂), 1,32 (d, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,50 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2,03 (mt, 1H, 3 β₁), 2,17 (mt, 1H, 5 δ₂), 2,39 (d large, J=16 Hz, 1H: 5 δ₁), 2,44 (d, J=16 Hz, 1H: 5 β₁), 2,77 (s, 6H: N(CH₃)₂ 4), 2,85 (dt, J=13,5 et 4,5 Hz, 1H: 5 ε₂), 2,97 (dd, J=12 et 5 Hz, 1H: 4 β₂), 3,23 (s, 3H: NCH₃ 4), 3,35 (t, J=12 Hz, 1H: 4 β₁), 3,30 et 3,58 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 4,57 (dd, J=8 et 7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,76 (dd large, J=13,5 et 8 Hz, 1H: 5 ε₁), 4,85 (mt, 1H: 2α), 4,90 (dd, J=10 et 1,5 Hz, 1H: 1α), 5,25 (dd, J=12 et 5 Hz, 1H: 4 α), 5,31 (d large, J=6 Hz, 1H: 5 α), 5,86 (d, J=9,5 Hz, 1H: 6 α), 5,90 (mt, 1H: 1β), 6,50 (d, J=10 Hz, 1H: NH 2), 6,97 (d, J=8 Hz, 1H: H 5 de l'aromatique en 4), 7,08 (dd, J=8 et 2 Hz, 1H: H 6 de l'aromatique en 4), de 7,15 à 7,40 (mt, 6H: H Aromatiques 6 et H 2 de l'aromatique en 4), 7,43 (dd, J=8,5 et 2 Hz, 1H: 1' H₄), 7,52 (dd, J=8,5 et 4,5 Hz, 1H: 1' H₅), 7,83 (dd, J=4,5 et 2 Hz, 1H: 1' H₆), 8,38 (d, J=10 Hz, 1H: NH 1), 8,73 (d, J=9,5 Hz, 1H: NH 6), 11,65 (s, 1H: OH).

Exemple B

4ε-bromo pristinamycine I_A

On place dans un ballon 30 g de pristinamycine I_A dans 300 cm³ de dichlorométhane puis on ajoute 6,85 g de N-bromosuccinimide. Le mélange est agité à température ambiante pendant 29 heures puis concentré à sec sous pression réduite. Le solide obtenu est agité dans 400 cm³ d'éther diéthylique, filtré puis lavé par 2 fois 100 cm³ d'éther diéthylique. Après filtration le solide est trituré pendant

1600 cm³ d'éthanol au reflux. Après refroidissement, filtration des cristaux et séchage sous pression réduite (135 Pa) à 50°C on obtient

23,2 g de 4e-bromo pristinamycine I_A sous forme de cristaux blancs fondant à 220°C.

Spectre de R.M.N. du proton (300 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 0,58 (dd, J=16 et 6 Hz, 1H, 5 β₂), 0,91 (t, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1,10 à 1,40 (mt, 2H: 3 β₂ et 3 γ₂), 1,32 (d, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,50 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2,03 (mt, 1H, 3 β₁), 2,19 (mt, 1H, 5 δ₂), 2,39 (d large, J=16 Hz, 1H: 5 δ₁), 2,44 (d, J=16 Hz, 1H: 5 β₁), 2,76 (s, 6H: N(CH₃)₂ 4), 2,83 (dt, J=13,5 et 4 Hz, 1H: 5 ε₂), 2,97 (dd, J=12,5 et 4,5 Hz, 1H: 4 β₂), 3,23 (s, 3H: NCH₃ 4), 3,30 et 3,57 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3,33 (t, J=12,5 Hz, 1H: 4 β₁), 4,55 (dd, J=8 et 7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,74 (dd large, J=13,5 et 8 Hz, 1H: 5 ε₁), 4,84 (mt, 1H: 2α), 4,92 (dd, J=10 et 2 Hz, 1H: 1α), 5,27 (dd, J=12,5 et 4,5 Hz, 1H: 4 α), 5,33 (d large, J=6 Hz, 1H: 5 α), 5,88 (d, J=9,5 Hz, 1H: 6 α), 5,90 (mt, 1H: 1β), 6,53 (d, J=10 Hz, 1H: NH 2), 7,00 (d, J=8 Hz, 1H: H 5 de l'aromatique en 4), 7,12 (dd, J=8 et 2 Hz, 1H: H 6 de l'aromatique en 4), de 7,15 à 7,40 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,43 (dd, J=8,5 et 2 Hz, 1H: 1' H₄), 7,46 (d, J=2 Hz, 1H: H 2 de l'aromatique en 4), 7,52 (dd, J=8,5 et 4,5 Hz, 1H: 1' H₅), 7,87 (dd, J=4,5 et 2 Hz, 1H: 1' H₆), 8,41 (d, J=10 Hz, 1H: NH 1), 8,74 (d, J=9,5 Hz, 1H: NH 6), 11,65 (s, 1H: OH).

Exemple C

4e-chloro pristinamycine I_B

En opérant comme à l'exemple A mais à partir de 1,7 g de pristinamycine I_B, de 320 mg de N-chlorosuccinimide dans 17 cm³ d'acétonitrile, on obtient après 1 heure 30 minutes de reflux puis concentration à sec du mélange réactionnel, 1,8 g d'un solide beige qui est purifié par chromatographie flash (éluant dichlorométhane-méthanol, 98/2) pour donner 1,2 g de 4e-chloro pristinamycine I_B.

Spectre de R.M.N. du proton (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 0,79 (dd, J=16 et 5,5 Hz, 1H, 5 β₂), 0,91 (t, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1,15 (mt, 1H: 3 β₂), de 1,25 à 1,40 (mt, 1H: 3 γ₂), 1,34 (d, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,50 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2,03 (mt, 1H, 3 β₁), 2,19 (mt, 1H, 5 δ₂), 2,39 (d large, J=16 Hz, 1H: 5 δ₁), 2,44 (d, J=16 Hz, 1H: 5 β₁), 2,76 (s, 6H: N(CH₃)₂ 4), 2,83 (dt, J=13,5 et 4 Hz, 1H: 5 ε₂), 2,97 (dd, J=12,5 et 4,5 Hz, 1H: 4 β₂), 3,23 (s, 3H: NCH₃ 4), 3,30 et 3,57 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3,33 (t, J=12,5 Hz, 1H: 4 β₁), 4,55 (dd, J=8 et 7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,74 (dd large, J=13,5 et 8 Hz, 1H: 5 ε₁), 4,84 (mt, 1H: 2α), 4,92 (dd, J=10 et 2 Hz, 1H: 1α), 5,27 (dd, J=12,5 et 4,5 Hz, 1H: 4 α), 5,33 (d large, J=6 Hz, 1H: 5 α), 5,88 (d, J=9,5 Hz, 1H: 6 α), 5,90 (mt, 1H: 1β), 6,53 (d, J=10 Hz, 1H: NH 2), 7,00 (d, J=8 Hz, 1H: H 5 de l'aromatique en 4), 7,12 (dd, J=8 et 2 Hz, 1H: H 6 de l'aromatique en 4), de 7,15 à 7,40 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,43 (dd, J=8,5 et 2 Hz, 1H: 1' H₄), 7,46 (d, J=2 Hz, 1H: H 2 de l'aromatique en 4), 7,52 (dd, J=8,5 et 4,5 Hz, 1H: 1' H₅), 7,87 (dd, J=4,5 et 2 Hz, 1H: 1' H₆), 8,41 (d, J=10 Hz, 1H: NH 1), 8,74 (d, J=9,5 Hz, 1H: NH 6), 11,65 (s, 1H: OH).

2,23 (mt, 1H, 5 δ_2), 2,40 (d large, J=16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2,47 (d, J=16 Hz, 1H: 5 β_1), 2,85 (dt, J=13 et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), de 2,85 à 2,90 (mt, 1H: 4 β_2), 2,88 (s, 3H: ArNCH₃ 4), 3,25 (s, 3H: NCH₃ 4), 3,28 et 3,58 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3,31 (t, J=12 Hz, 1H: 4 β_1), 4,40 (mf, 1H: ArNH), 4,57 (t, J=7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,78 (dd large, J=13 et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4,84 (mt, 1H: 2 α), 4,91 (d large, J=10 Hz, 1H: 1 α), 5,23 (dd, J=12 et 5 Hz, 1H: 4 α), 5,36 (d large, J=5,5 Hz, 1H: 5 α), 5,89 (d, J=9,5 Hz, 1H: 6 α), 5,90 (mt, 1H: 1 β), 6,51 (d, J=10 Hz, 1H: NH 2), 6,55 (d, J=8 Hz, 1H: H 5 de l'aromatique en 4), 7,0,2 (dd, J=8 et 2 Hz, 1H: H 6 de l'aromatique en 4), 7,13 (d, J=2 Hz, 1H: H 2 de l'aromatique en 4), de 7,15 à 7,40 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,43 (d large, J=8,5 Hz, 1H: 1' H₄), 7,52 (dd, J=8,5 et 4,5 Hz, 1H: 1' H₅), 7,79 (d large, J=4,5 Hz, 1H: 1' H₆), 8,40 (d, J=10 Hz, 1H: NH 1), 8,75 (d, J=9,5 Hz, 1H: NH 6), 11,63 (s, 1H: OH).

15 Exemple D

4 ϵ -bromo pristinamycine I_B

En opérant comme à l'exemple B mais à partir de 2 g de pristinamycine I_B, de 420 mg de N-bromosuccinimide dans 30 cm³ de dichlorométhane, on obtient après 1 heure 30 minutes d'agitation à température ambiante, puis concentration à sec du mélange réactionnel, 2,1 g d'un solide beige qui est purifié par chromatographie flash (éluant dichlorométhane-méthanol, 98/2) pour donner 1,7 g de 4 ϵ -bromo pristinamycine I_B sous forme d'un solide blanc fondant à 220°C.

Spectre de R.M.N. du proton (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 0,80 (dd, J=16 et 5,5 Hz, 1H, 5 β_2), 0,90 (t, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1,13 (mt, 1H: 3 β_2), de 1,20 à 1,40 (mt, 1H: 3 γ_2), 1,33 (d, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,50 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 2,03 (mt, 1H, 3 β_1), 2,28 (mt, 1H, 5 δ_2), 2,40 (d large, J=16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2,46 (d, J=16

4), 3,30 et 3,58 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3,31 (t, J=12 Hz, 1H: 4 β_1), 4,41 (q, J=5,5 Hz, 1H: ArNH), 4,57 (t, J=7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,78 (dd large, J=13 et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4,85 (mt, 1H: 2 α), 4,91 (d large,

J=10 Hz, 1H: 1 α), 5,24 (dd, J=12 et 4 Hz, 1H: 4 α), 5,37 (d large, J=5,5 Hz, 1H: 5 α), 5,89 (d, J=9,5 Hz, 1H: 6 α), 5,90 (mt, 1H: 1 β), 6,51 (d, J=10 Hz, 1H: NH 2), 6,53 (d, J=8 Hz, 1H: H 5 de l'aromatique en 4), 7,0,5 (dd, J=8 et 2 Hz, 1H: H 6 de l'aromatique en 4), de 7,15 à 7,40 (mt, 6H: H Aromatiques 6 et H 2 de l'aromatique en 4), 7,43 (d large, J=8,5 Hz, 1H: 1' H₄), 7,48 (dd, J=8,5 et 5 Hz, 1H: 1' H₅), 7,79 (d large, J =5 Hz, 1H: 1' H₆), 8,40 (d, J=10 Hz, 1H: NH 1), 8,76 (d, J=9,5 Hz, 1H: NH 6), 11,63 (s, 1H: OH).

Exemple E

10 4 ϵ -allyl pristinamycine IA

On place dans un tricol maintenu sous atmosphère d'azote 7,07 g d'acétate de sodium dans 100 cm³ d'eau distillée. La solution est portée au reflux puis on ajoute par une ampoule de coulée, une solution de 15,5 g de bromure de 4-N-allylammonio pristinamycine I_A dans 100 cm³ d'eau distillée. Après 2 heures de réaction on ajoute 1 g d'acétate de sodium et le mélange est agité 22 heures au reflux. Une nouvelle portion de 5 g d'acétate de sodium est ajoutée et la réaction poursuivie pendant 20 heures. Le précipité formé est filtré à chaud, rincé par 2 fois 50 cm³ d'eau distillée puis séché sous pression réduite (2,75 kPa) pour donner 7 g d'un solide blanc qui est purifié par chromatographie flash (éluant : toluène, acétone 70/30) pour donner 4,6 g de 4 ϵ -allyl pristinamycine I_A sous forme d'un solide blanc fondant à 160°C.

Spectre de R.M.N. du proton (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 0,42 (dd, J=16 et 5,5 Hz, 1H, 5 β_2), 0,92 (t, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1,15 à 1,40 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1,33 (d, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,55 à 1,80 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), de 2,00 à 2,15 (mt, 2H, 3 β_1 et 5 δ), 2,30 (d large, J=16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2,33 (d, J=16 Hz, 1H: 5 β_1),

et 1H du ArCH₂ allyle), 3,25 (s, 3H: NCH₃ 4), 3,48 (dd, J=16 et 6,5 Hz, 1H: 1' autre H du ArCH₂ allyle), 3,56 (mt, 1H: 3 δ_2), 4,57 (dd, J=16 et 5 Hz, 1H: 4 α), 4,64 (d large, J=16,5 et 7,5 Hz, 1H: 5

ϵ_1), 4,84 (mt, 1H: 2 α), 4,90 (d large, J=10 Hz, 1H: 1 α), de 5,00 à 5,15 (mt, 2H: =CH₂), 5,23 (d large, J=5,5 Hz, 1H: 5 α), 5,28 (dd, J=12 et 4,5 Hz, 1H 4 α), de 5,80 à 5,95 (mt, 3H: 6 α - 1 β et CH₂ allyle), 6,53 (d, J=10 Hz, 1H: NH 2), 7,04 (mt, 3H: H Aromatiques en 4), de 7,15 à 7,40 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,45 (dd, J=8,5 et 2 Hz, 1H: 1' H₄), 7,48 (dd, J=8,5 et 4 Hz, 1H: 1' H₅), 7,88 (dd, J=4 et 2 Hz, 1H: 1' H₆), 8,45 (d, J=10 Hz, 1H: NH 1), 8,76 (d, J=9,5 Hz, 1H: NH 6), 11,64 (s, 1H: OH).

Le bromure de 4-N-allylammonio pristinamycine I_A peut être préparé de la manière suivante :

On place dans un tricol maintenu sous atmosphère d'azote, 10 g de pristinamycine I_A en solution dans 25 cm³ de dichloro-1,2 éthane puis 2,5 cm³ de bromure d'allyle. Le mélange est chauffé 7 heures à 40°C puis agité à température ambiante pendant 14 heures. On ajoute alors sous agitation en 10 minutes, 200 cm³ de toluène et le mélange est agité 30 minutes. Le précipité formé est filtré, rincé par 50 cm³ de toluène puis séché sous pression réduite (135 Pa) à 45°C pour donner 10,5 g d'un solide qui est trituré dans 200 cm³ d'acétate d'éthyle à 40°C, puis à température ambiante pendant 1 heure. Le solide est filtré puis séché à 45°C sous pression réduite (135 Pa) pour donner 10 g de bromure de 4-N-allylammonio pristinamycine I_A sous forme d'un solide blanc fondant vers 210°C.

Spectre de R.M.N. du proton (400 MHz, CDCl₃ avec ajout de quelques gouttes de CD₃ OD d₄, δ en ppm): 0,75 (t, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1,00 à 1,35 (mt, 3H: 3 β_2 - 3 γ_2 et 5 β_2), 1,18 (d, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,45 à 1,65 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 1,95 (mt, 1H: 3 β_1), 2,15 (mt, 1H: 5 δ_2), 2,28 (d large, J=16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2,55 (d, J=16 Hz, 1H: 5 β_1), 2,72 (dt, J=13,5 et 4,5 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2,95 (s, 3H: NH 4).

Spectre de R.M.N. du proton (400 MHz, CDCl₃ avec ajout de quelques gouttes de CD₃ OD d₄, δ en ppm): 0,75 (t, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), de 1,00 à 1,35 (mt, 3H: 3 β_2 - 3 γ_2 et 5 β_2), 1,18 (d, J=7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,45 à 1,65 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 1,95 (mt, 1H: 3 β_1), 2,15 (mt, 1H: 5 δ_2), 2,28 (d large, J=16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2,55 (d, J=16 Hz, 1H: 5 β_1), 2,72 (dt, J=13,5 et 4,5 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2,95 (s, 3H: NH 4).

H₅), 7,60 (d, J=8,5 Hz, 2H: 4 e), 7,65 (mt, 1H: 1' H₆), 8,58 (d, J=9,5 Hz, 1H: NH 6).

Exemple F

Préparation de la 4ζ-tert-butyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine
5 I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 4-tert-butylphénylalanine(R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,8
10 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et
15 évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par palliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu
20 sec est repris par 7 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par
25 un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 30 mg de 4ζ-tertbutyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

Le produit est caractérisé par les données suivantes :
tert-butyle), 1,35 (d, J = 7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,50 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2,04 (mt, 1H, 3 β₁), 2,13 (mt, 1H, 5 δ₂), 2,30
et 2,31 (mt, 2H: 4 e et 4 f), 2,35 (mt, 1H: 1' H₆), 2,45 (mt, 1H: 2' H₆), 2,55 (mt, 1H: 3' H₆), 2,65 (mt, 1H: 4' H₆), 2,75 (mt, 1H: 5' H₆), 2,85 (mt, 1H: 6' H₆), 2,95 (mt, 1H: 7' H₆), 3,05 (mt, 1H: 8' H₆), 3,15 (mt, 1H: 9' H₆), 3,25 (mt, 1H: 10' H₆), 3,35 (mt, 1H: 11' H₆), 3,45 (mt, 1H: 12' H₆), 3,55 (mt, 1H: 13' H₆), 3,65 (mt, 1H: 14' H₆), 3,75 (mt, 1H: 15' H₆), 3,85 (mt, 1H: 16' H₆), 3,95 (mt, 1H: 17' H₆), 4,05 (mt, 1H: 18' H₆), 4,15 (mt, 1H: 19' H₆), 4,25 (mt, 1H: 20' H₆), 4,35 (mt, 1H: 21' H₆), 4,45 (mt, 1H: 22' H₆), 4,55 (mt, 1H: 23' H₆), 4,65 (mt, 1H: 24' H₆), 4,75 (mt, 1H: 25' H₆), 4,85 (mt, 1H: 26' H₆), 4,95 (mt, 1H: 27' H₆), 5,05 (mt, 1H: 28' H₆), 5,15 (mt, 1H: 29' H₆), 5,25 (mt, 1H: 30' H₆), 5,35 (mt, 1H: 31' H₆), 5,45 (mt, 1H: 32' H₆), 5,55 (mt, 1H: 33' H₆), 5,65 (mt, 1H: 34' H₆), 5,75 (mt, 1H: 35' H₆), 5,85 (mt, 1H: 36' H₆), 5,95 (mt, 1H: 37' H₆), 6,05 (mt, 1H: 38' H₆), 6,15 (mt, 1H: 39' H₆), 6,25 (mt, 1H: 40' H₆), 6,35 (mt, 1H: 41' H₆), 6,45 (mt, 1H: 42' H₆), 6,55 (mt, 1H: 43' H₆), 6,65 (mt, 1H: 44' H₆), 6,75 (mt, 1H: 45' H₆), 6,85 (mt, 1H: 46' H₆), 6,95 (mt, 1H: 47' H₆), 7,05 (mt, 1H: 48' H₆), 7,15 (mt, 1H: 49' H₆), 7,25 (mt, 1H: 50' H₆), 7,35 (mt, 1H: 51' H₆), 7,45 (mt, 1H: 52' H₆), 7,55 (mt, 1H: 53' H₆), 7,65 (mt, 1H: 54' H₆), 7,75 (mt, 1H: 55' H₆), 7,85 (mt, 1H: 56' H₆), 7,95 (mt, 1H: 57' H₆), 8,05 (mt, 1H: 58' H₆), 8,15 (mt, 1H: 59' H₆), 8,25 (mt, 1H: 60' H₆), 8,35 (mt, 1H: 61' H₆), 8,45 (mt, 1H: 62' H₆), 8,55 (mt, 1H: 63' H₆), 8,65 (mt, 1H: 64' H₆), 8,75 (mt, 1H: 65' H₆), 8,85 (mt, 1H: 66' H₆), 8,95 (mt, 1H: 67' H₆), 9,05 (mt, 1H: 68' H₆), 9,15 (mt, 1H: 69' H₆), 9,25 (mt, 1H: 70' H₆), 9,35 (mt, 1H: 71' H₆), 9,45 (mt, 1H: 72' H₆), 9,55 (mt, 1H: 73' H₆), 9,65 (mt, 1H: 74' H₆), 9,75 (mt, 1H: 75' H₆), 9,85 (mt, 1H: 76' H₆), 9,95 (mt, 1H: 77' H₆), 10,05 (mt, 1H: 78' H₆), 10,15 (mt, 1H: 79' H₆), 10,25 (mt, 1H: 80' H₆), 10,35 (mt, 1H: 81' H₆), 10,45 (mt, 1H: 82' H₆), 10,55 (mt, 1H: 83' H₆), 10,65 (mt, 1H: 84' H₆), 10,75 (mt, 1H: 85' H₆), 10,85 (mt, 1H: 86' H₆), 10,95 (mt, 1H: 87' H₆), 11,05 (mt, 1H: 88' H₆), 11,15 (mt, 1H: 89' H₆), 11,25 (mt, 1H: 90' H₆), 11,35 (mt, 1H: 91' H₆), 11,45 (mt, 1H: 92' H₆), 11,55 (mt, 1H: 93' H₆), 11,65 (mt, 1H: 94' H₆), 11,75 (mt, 1H: 95' H₆), 11,85 (mt, 1H: 96' H₆), 11,95 (mt, 1H: 97' H₆), 12,05 (mt, 1H: 98' H₆), 12,15 (mt, 1H: 99' H₆), 12,25 (mt, 1H: 100' H₆), 12,35 (mt, 1H: 101' H₆), 12,45 (mt, 1H: 102' H₆), 12,55 (mt, 1H: 103' H₆), 12,65 (mt, 1H: 104' H₆), 12,75 (mt, 1H: 105' H₆), 12,85 (mt, 1H: 106' H₆), 12,95 (mt, 1H: 107' H₆), 13,05 (mt, 1H: 108' H₆), 13,15 (mt, 1H: 109' H₆), 13,25 (mt, 1H: 110' H₆), 13,35 (mt, 1H: 111' H₆), 13,45 (mt, 1H: 112' H₆), 13,55 (mt, 1H: 113' H₆), 13,65 (mt, 1H: 114' H₆), 13,75 (mt, 1H: 115' H₆), 13,85 (mt, 1H: 116' H₆), 13,95 (mt, 1H: 117' H₆), 14,05 (mt, 1H: 118' H₆), 14,15 (mt, 1H: 119' H₆), 14,25 (mt, 1H: 120' H₆), 14,35 (mt, 1H: 121' H₆), 14,45 (mt, 1H: 122' H₆), 14,55 (mt, 1H: 123' H₆), 14,65 (mt, 1H: 124' H₆), 14,75 (mt, 1H: 125' H₆), 14,85 (mt, 1H: 126' H₆), 14,95 (mt, 1H: 127' H₆), 15,05 (mt, 1H: 128' H₆), 15,15 (mt, 1H: 129' H₆), 15,25 (mt, 1H: 130' H₆), 15,35 (mt, 1H: 131' H₆), 15,45 (mt, 1H: 132' H₆), 15,55 (mt, 1H: 133' H₆), 15,65 (mt, 1H: 134' H₆), 15,75 (mt, 1H: 135' H₆), 15,85 (mt, 1H: 136' H₆), 15,95 (mt, 1H: 137' H₆), 16,05 (mt, 1H: 138' H₆), 16,15 (mt, 1H: 139' H₆), 16,25 (mt, 1H: 140' H₆), 16,35 (mt, 1H: 141' H₆), 16,45 (mt, 1H: 142' H₆), 16,55 (mt, 1H: 143' H₆), 16,65 (mt, 1H: 144' H₆), 16,75 (mt, 1H: 145' H₆), 16,85 (mt, 1H: 146' H₆), 16,95 (mt, 1H: 147' H₆), 17,05 (mt, 1H: 148' H₆), 17,15 (mt, 1H: 149' H₆), 17,25 (mt, 1H: 150' H₆), 17,35 (mt, 1H: 151' H₆), 17,45 (mt, 1H: 152' H₆), 17,55 (mt, 1H: 153' H₆), 17,65 (mt, 1H: 154' H₆), 17,75 (mt, 1H: 155' H₆), 17,85 (mt, 1H: 156' H₆), 17,95 (mt, 1H: 157' H₆), 18,05 (mt, 1H: 158' H₆), 18,15 (mt, 1H: 159' H₆), 18,25 (mt, 1H: 160' H₆), 18,35 (mt, 1H: 161' H₆), 18,45 (mt, 1H: 162' H₆), 18,55 (mt, 1H: 163' H₆), 18,65 (mt, 1H: 164' H₆), 18,75 (mt, 1H: 165' H₆), 18,85 (mt, 1H: 166' H₆), 18,95 (mt, 1H: 167' H₆), 19,05 (mt, 1H: 168' H₆), 19,15 (mt, 1H: 169' H₆), 19,25 (mt, 1H: 170' H₆), 19,35 (mt, 1H: 171' H₆), 19,45 (mt, 1H: 172' H₆), 19,55 (mt, 1H: 173' H₆), 19,65 (mt, 1H: 174' H₆), 19,75 (mt, 1H: 175' H₆), 19,85 (mt, 1H: 176' H₆), 19,95 (mt, 1H: 177' H₆), 20,05 (mt, 1H: 178' H₆), 20,15 (mt, 1H: 179' H₆), 20,25 (mt, 1H: 180' H₆), 20,35 (mt, 1H: 181' H₆), 20,45 (mt, 1H: 182' H₆), 20,55 (mt, 1H: 183' H₆), 20,65 (mt, 1H: 184' H₆), 20,75 (mt, 1H: 185' H₆), 20,85 (mt, 1H: 186' H₆), 20,95 (mt, 1H: 187' H₆), 21,05 (mt, 1H: 188' H₆), 21,15 (mt, 1H: 189' H₆), 21,25 (mt, 1H: 190' H₆), 21,35 (mt, 1H: 191' H₆), 21,45 (mt, 1H: 192' H₆), 21,55 (mt, 1H: 193' H₆), 21,65 (mt, 1H: 194' H₆), 21,75 (mt, 1H: 195' H₆), 21,85 (mt, 1H: 196' H₆), 21,95 (mt, 1H: 197' H₆), 22,05 (mt, 1H: 198' H₆), 22,15 (mt, 1H: 199' H₆), 22,25 (mt, 1H: 200' H₆), 22,35 (mt, 1H: 201' H₆), 22,45 (mt, 1H: 202' H₆), 22,55 (mt, 1H: 203' H₆), 22,65 (mt, 1H: 204' H₆), 22,75 (mt, 1H: 205' H₆), 22,85 (mt, 1H: 206' H₆), 22,95 (mt, 1H: 207' H₆), 23,05 (mt, 1H: 208' H₆), 23,15 (mt, 1H: 209' H₆), 23,25 (mt, 1H: 210' H₆), 23,35 (mt, 1H: 211' H₆), 23,45 (mt, 1H: 212' H₆), 23,55 (mt, 1H: 213' H₆), 23,65 (mt, 1H: 214' H₆), 23,75 (mt, 1H: 215' H₆), 23,85 (mt, 1H: 216' H₆), 23,95 (mt, 1H: 217' H₆), 24,05 (mt, 1H: 218' H₆), 24,15 (mt, 1H: 219' H₆), 24,25 (mt, 1H: 220' H₆), 24,35 (mt, 1H: 221' H₆), 24,45 (mt, 1H: 222' H₆), 24,55 (mt, 1H: 223' H₆), 24,65 (mt, 1H: 224' H₆), 24,75 (mt, 1H: 225' H₆), 24,85 (mt, 1H: 226' H₆), 24,95 (mt, 1H: 227' H₆), 25,05 (mt, 1H: 228' H₆), 25,15 (mt, 1H: 229' H₆), 25,25 (mt, 1H: 230' H₆), 25,35 (mt, 1H: 231' H₆), 25,45 (mt, 1H: 232' H₆), 25,55 (mt, 1H: 233' H₆), 25,65 (mt, 1H: 234' H₆), 25,75 (mt, 1H: 235' H₆), 25,85 (mt, 1H: 236' H₆), 25,95 (mt, 1H: 237' H₆), 26,05 (mt, 1H: 238' H₆), 26,15 (mt, 1H: 239' H₆), 26,25 (mt, 1H: 240' H₆), 26,35 (mt, 1H: 241' H₆), 26,45 (mt, 1H: 242' H₆), 26,55 (mt, 1H: 243' H₆), 26,65 (mt, 1H: 244' H₆), 26,75 (mt, 1H: 245' H₆), 26,85 (mt, 1H: 246' H₆), 26,95 (mt, 1H: 247' H₆), 27,05 (mt, 1H: 248' H₆), 27,15 (mt, 1H: 249' H₆), 27,25 (mt, 1H: 250' H₆), 27,35 (mt, 1H: 251' H₆), 27,45 (mt, 1H: 252' H₆), 27,55 (mt, 1H: 253' H₆), 27,65 (mt, 1H: 254' H₆), 27,75 (mt, 1H: 255' H₆), 27,85 (mt, 1H: 256' H₆), 27,95 (mt, 1H: 257' H₆), 28,05 (mt, 1H: 258' H₆), 28,15 (mt, 1H: 259' H₆), 28,25 (mt, 1H: 260' H₆), 28,35 (mt, 1H: 261' H₆), 28,45 (mt, 1H: 262' H₆), 28,55 (mt, 1H: 263' H₆), 28,65 (mt, 1H: 264' H₆), 28,75 (mt, 1H: 265' H₆), 28,85 (mt, 1H: 266' H₆), 28,95 (mt, 1H: 267' H₆), 29,05 (mt, 1H: 268' H₆), 29,15 (mt, 1H: 269' H₆), 29,25 (mt, 1H: 270' H₆), 29,35 (mt, 1H: 271' H₆), 29,45 (mt, 1H: 272' H₆), 29,55 (mt, 1H: 273' H₆), 29,65 (mt, 1H: 274' H₆), 29,75 (mt, 1H: 275' H₆), 29,85 (mt, 1H: 276' H₆), 29,95 (mt, 1H: 277' H₆), 30,05 (mt, 1H: 278' H₆), 30,15 (mt, 1H: 279' H₆), 30,25 (mt, 1H: 280' H₆), 30,35 (mt, 1H: 281' H₆), 30,45 (mt, 1H: 282' H₆), 30,55 (mt, 1H: 283' H₆), 30,65 (mt, 1H: 284' H₆), 30,75 (mt, 1H: 285' H₆), 30,85 (mt, 1H: 286' H₆), 30,95 (mt, 1H: 287' H₆), 31,05 (mt, 1H: 288' H₆), 31,15 (mt, 1H: 289' H₆), 31,25 (mt, 1H: 290' H₆), 31,35 (mt, 1H: 291' H₆), 31,45 (mt, 1H: 292' H₆), 31,55 (mt, 1H: 293' H₆), 31,65 (mt, 1H: 294' H₆), 31,75 (mt, 1H: 295' H₆), 31,85 (mt, 1H: 296' H₆), 31,95 (mt, 1H: 297' H₆), 32,05 (mt, 1H: 298' H₆), 32,15 (mt, 1H: 299' H₆), 32,25 (mt, 1H: 300' H₆), 32,35 (mt, 1H: 301' H₆), 32,45 (mt, 1H: 302' H₆), 32,55 (mt, 1H: 303' H₆), 32,65 (mt, 1H: 304' H₆), 32,75 (mt, 1H: 305' H₆), 32,85 (mt, 1H: 306' H₆), 32,95 (mt, 1H: 307' H₆), 33,05 (mt, 1H: 308' H₆), 33,15 (mt, 1H: 309' H₆), 33,25 (mt, 1H: 310' H₆), 33,35 (mt, 1H: 311' H₆), 33,45 (mt, 1H: 312' H₆), 33,55 (mt, 1H: 313' H₆), 33,65 (mt, 1H: 314' H₆), 33,75 (mt, 1H: 315' H₆), 33,85 (mt, 1H: 316' H₆), 33,95 (mt, 1H: 317' H₆), 34,05 (mt, 1H: 318' H₆), 34,15 (mt, 1H: 319' H₆), 34,25 (mt, 1H: 320' H₆), 34,35 (mt, 1H: 321' H₆), 34,45 (mt, 1H: 322' H₆), 34,55 (mt, 1H: 323' H₆), 34,65 (mt, 1H: 324' H₆), 34,75 (mt, 1H: 325' H₆), 34,85 (mt, 1H: 326' H₆), 34,95 (mt, 1H: 327' H₆), 35,05 (mt, 1H: 328' H₆), 35,15 (mt, 1H: 329' H₆), 35,25 (mt, 1H: 330' H₆), 35,35 (mt, 1H: 331' H₆), 35,45 (mt, 1H: 332' H₆), 35,55 (mt, 1H: 333' H₆), 35,65 (mt, 1H: 334' H₆), 35,75 (mt, 1H: 335' H₆), 35,85 (mt, 1H: 336' H₆), 35,95 (mt, 1H: 337' H₆), 36,05 (mt, 1H: 338' H₆), 36,15 (mt, 1H: 339' H₆), 36,25 (mt, 1H: 340' H₆), 36,35 (mt, 1H: 341' H₆), 36,45 (mt, 1H: 342' H₆), 36,55 (mt, 1H: 343' H₆), 36,65 (mt, 1H: 344' H₆), 36,75 (mt, 1H: 345' H₆), 36,85 (mt, 1H: 346' H₆), 36,95 (mt, 1H: 347' H₆), 37,05 (mt, 1H: 348' H₆), 37,15 (mt, 1H: 349' H₆), 37,25 (mt, 1H: 350' H₆), 37,35 (mt, 1H: 351' H₆), 37,45 (mt, 1H: 352' H₆), 37,55 (mt, 1H: 353' H₆), 37,65 (mt, 1H: 354' H₆), 37,75 (mt, 1H: 355' H₆), 37,85 (mt, 1H: 356' H₆), 37,95 (mt, 1H: 357' H₆), 38,05 (mt, 1H: 358' H₆), 38,15 (mt, 1H: 359' H₆), 38,25 (mt, 1H: 360' H₆), 38,35 (mt, 1H: 361' H₆), 38,45 (mt, 1H: 362' H₆), 38,55 (mt, 1H: 363' H₆), 38,65 (mt, 1H: 364' H₆), 38,75 (mt, 1H: 365' H₆), 38,85 (mt, 1H: 366' H₆), 38,95 (mt, 1H: 367' H₆), 39,05 (mt, 1H: 368' H₆), 39,15 (mt, 1H: 369' H₆), 39,25 (mt, 1H: 370' H₆), 39,35 (mt, 1H: 371' H₆), 39,45 (mt, 1H: 372' H₆), 39,55 (mt, 1H: 373' H₆), 39,65 (mt, 1H: 374' H₆), 39,75 (mt, 1H: 375' H₆), 39,85 (mt, 1H: 376' H₆), 39,95 (mt, 1H: 377' H₆), 40,05 (mt, 1H: 378' H₆), 40,15 (mt, 1H: 379' H₆), 40,25 (mt, 1H: 380' H₆), 40,35 (mt, 1H: 381' H₆), 40,45 (mt, 1H: 382' H₆), 40,55 (mt, 1H: 383' H₆), 40,65 (mt, 1H: 384' H₆), 40,75 (mt, 1H: 385' H₆), 40,85 (mt, 1H: 386' H₆), 40,95 (mt, 1H: 387' H₆), 41,05 (mt, 1H: 388' H₆), 41,15 (mt, 1H: 389' H₆), 41,25 (mt, 1H: 390' H₆), 41,35 (mt, 1H: 391' H₆), 41,45 (mt, 1H: 392' H₆), 41,55 (mt, 1H: 393' H₆), 41,65 (mt, 1H: 394' H₆), 41,75 (mt, 1H: 395' H₆), 41,85 (mt, 1H: 396' H₆), 41,95 (mt, 1H: 397' H₆), 42,05 (mt, 1H: 398' H₆), 42,15 (mt, 1H: 399' H₆), 42,25 (mt, 1H: 400' H₆), 42,35 (mt, 1H: 401' H₆), 42,45 (mt, 1H: 402' H₆), 42,55 (mt, 1H: 403' H₆), 42,65 (mt, 1H: 404' H₆), 42,75 (mt, 1H: 405' H₆), 42,85 (mt, 1H: 406' H₆), 42,95 (mt, 1H: 407' H₆), 43,05 (mt, 1H: 408' H₆), 43,15 (mt, 1H: 409' H₆), 43,25 (mt, 1H: 410' H₆), 43,35 (mt, 1H: 411' H₆), 43,45 (mt, 1H: 412' H₆), 43,55 (mt, 1H: 413' H₆), 43,65 (mt, 1H: 414' H₆), 43,75 (mt, 1H: 415' H₆), 43,85 (mt, 1H: 416' H₆), 43,95 (mt, 1H: 417' H₆), 44,05 (mt, 1H: 418' H₆), 44,15 (mt, 1H: 419' H₆), 44,25 (mt, 1H: 420' H₆), 44,35 (mt, 1H: 421' H₆), 44,45 (mt, 1H: 422' H₆), 44,55 (mt, 1H: 423' H₆), 44,65 (mt, 1H: 424' H₆), 44,75 (mt, 1H: 425' H₆), 44,85

(dd, $J = 12$ et 4 Hz, $1H$: $4\beta_2$), 3,29 (s, $3H$: NCH_3 4), 3,31 et 3,59 (2
 mts, $1H$ chacun: CH_2 3 δ), 3,40 (t, $J = 12$ Hz, $1H$: $4\beta_1$), 4,57 (t, $J =$
 7,5 Hz, $1H$, 3 α), 4,74 (dd large, $J = 13$ et 7 Hz, $1H$: $5\epsilon_1$), 4,85
 (mt, $1H$: 2α), 4,90 (d large, $J = 10$ Hz, $1H$: 1α), 5,21 (d large, $J =$
 5,5 Hz, $1H$: 5α), 5,25 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, $1H$: 4α), 5,87 (d, $J = 9$
 Hz, $1H$: 6α), 5,92 (q large, $J = 7,5$ Hz, $1H$: 1β), 6,56 (d, $J = 9,5$ Hz,
 $1H$: NH 2), de 7,10 à 7,30 (mt, $5H$: H Aromatiques 6), 7,28 (d, $J = 7,5$
 Hz, $2H$: 4δ), 7,38 (d, $J = 7,5$ Hz, $2H$: 4ϵ), 7,49 (d large, $J = 8,5$ Hz,
 $1H$: $1'H_4$), 7,53 (dd, $J = 8,5$ et 4 Hz, $1H$: $1'H_5$), 7,86 (d, $J = 4$ Hz,
 10 $1H$: $1'H_6$), 8,45 (d, $J = 10$ Hz, $1H$: NH 1), 8,74 (d, $J = 9$ Hz, $1H$: NH
 6), 11,65 (s, $1H$: OH).

Le chlorhydrate de 4-tert-butylphénylalanine (R,S) peut être préparé
 de la manière suivante :

Dans un tricol surmonté d'un réfrigérant sont additionnés 25 g de 4-
 15 (tert butyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle et 250 ml d'acide
 chlorhydrique à 37 %. Le mélange est agité et chauffé au reflux
 jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement gazeux. Après
 refroidissement du mélange réactionnel le précipité obtenu est filtré
 puis recristallisé dans l'acétonitrile pour donner 25,6 g de
 20 chlorhydrate de 4-tert-butylphénylalanine (R,S) sous forme d'un
 solide blanc fondant à $234^\circ C$.

Le 4-(tert butyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle peut être
 préparé de la manière suivante :

Dans un tricol surmonté d'un réfrigérant sont additionnés sous
 25 atmosphère d'azote, 25 g de bromure de 4-tert-butyl benzyle, 50 ml de
 toluène anhydre et 3,1 g d'hydrure de sodium en suspension dans
 l'huile à 80 % puis 21,8 g d'acétamido malonate de diéthyle. Le
 mélange est chauffé à $110^\circ C$ pendant 12 heures.

Après refroidissement le mélange est versé dans 500 ml d'eau. La phase
 organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 3 fois 50 ml
 d'éther diéthylique. Les phases organiques sont réunies, lavées à
 l'eau puis séchées sur sulfate de sodium. Après filtration et

concentration sous pression réduite, le produit est cristallisé dans l'éther de pétrole pour donner 25 g de 4-(tert-butyl) benzyl acétamidomalonate de diéthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 80°C.

- 5 Le mutant SP92::pVRC508 a été cultivé en milieu de production liquide. La fermentation a été réalisée comme suit : 0,5 ml d'une suspension de spores de la souche précitée est ajouté en conditions stériles à 40 ml de milieu inoculum dans un erlen chicané de 300 ml. Le milieu inoculum est constitué par 10 g/l de Corn Steep, 15 g/l de
- 10 saccharose, 10 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de K_2HPO_4 , 3 g/l de NaCl, 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1,25 g/l de CaCO_3 . Le pH est ajusté à 6,9 par de la soude avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités pendant 44 heures à 27°C sur un agitateur rotatif à la vitesse de 325 rpm. 2,5 ml de la culture précédente âgée de
- 15 44 heures sont ajoutés stérilement à 30 ml de milieu de production dans un erlen de 300 ml. Le milieu de production est constitué par 25 g/l de farine de soja, 7,5 g/l d'amidon, 22,5 g/l de glucose, 3,5 g/l de levure fourragère, 0,5 g/l de sulfate de zinc et 6 g/l de carbonate de calcium. Le pH est ajusté à 6,0 par de l'acide
- 20 chlorhydrique avant l'introduction du carbonate de calcium. Les erlens sont agités à 27°C sur un agitateur rotatif à la vitesse de 325 rpm. Au bout de 16 heures, 1 ml d'une solution d'un des précurseurs listés dans le tableau 3 (généralement 5 ou 10 g/l) est ajouté à la culture. Celle-ci est arrêtée 8 ou 24 heures plus tard.
- 25 Aussitôt le moût est volumé et on lui ajoute 2 volumes de phase mobile composée de 34 % d'acétonitrile et 66 % d'une solution de 0,1 M de KH_2PO_4 (ajusté à pH 2,9 par H_3PO_4 concentré) permettant l'extraction des pristinamycines. Après agitation, le tout est centrifugé et les pristinamycines contenues dans le surnageant sont
- 30 extraites et purifiées. Elles sont également dosées par CLHP et
- d'acétonitrile et de 60 % de tampon phosphate 0,1 M pH 2,9.

12 Hz, 1H: 4 β_1), 4,55 (t, J = 7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,72 (dd large, J = 13 et 7 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4,85 (mt, 1H: 2 α), 4,88 (d large, J = 10 Hz, 1H: 1 α), 5,21 (d large, J = 5,5 Hz, 1H: 5 α), 5,25 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H: 4 α), 5,87 (d, J = 9 Hz, 1H: 6 α), 5,90 (q large, J = 7,5 Hz, 1H: 1 β), 6,50 (d, J = 9,5 Hz, 1H: NH 2), de 7,05 à 7,35 (mt, 9H: H Aromatiques 6 - 4 ϵ et 4 δ), 7,50 (mt, 2H: 1' H₅ et 1' H₄), 7,86 (dd, J = 4 et 1,5 Hz, 1H: 1' H₆), 8,40 (d, J = 10 Hz, 1H: NH 1), 8,72 (d, J = 9 Hz, 1H: NH 6), 11,60 (s, 1H: OH).

La 4-isopropylphénylalanine (R,S) peut être préparée de la manière suivante :

On place dans un tricol 7 g de phosphore rouge et 8 g de 4-(isopropyl benzyldène) 2-méthyl 5-oxazolone dans 45 ml d'anhydride acétique puis on ajoute lentement sous agitation à l'aide d'une ampoule de coulée 35 ml d'acide iodhydrique à 57 %. En fin d'addition le mélange est chauffé 3 heures 30 minutes au reflux puis laissé 3 jours à température ambiante. Le mélange réactionnel est filtré, le solide obtenu rincé par 2 fois 10 ml d'acide acétique puis le filtrat concentré à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris par 100 ml d'eau distillée, concentré à sec sous pression réduite pour donner un solide qui est repris dans 50 ml d'eau distillée puis extrait par 3 fois 50 ml d'éther diéthylique après addition de 0,5 g de sulfite de sodium. L'éther est décanté et la phase aqueuse placée sous pression réduite pour éliminer les traces d'éther diéthylique. On ajoute à la phase aqueuse 2 g de noir animal, on chauffe à 40-50°C, on filtre sur Clarcel puis on rince avec un minimum d'eau. Le pH est ajusté à 5 par addition, à 4°C, d'ammoniaque à 32 %. Le précipité obtenu est filtré à froid, rincé par 2 fois 10 ml d'eau, 10 ml d'éthanol puis par 2 fois 10 ml d'éther pour donner après séchage sous pression réduite à 20°C, 3,97 g de 4-isopropyl-phényl-

La 4-(isopropyl benzyldène) 2-méthyl 5-oxazolone peut être préparée de la manière suivante :

On place dans un ballon muni d'un réfrigérant, 18,52 g de N-acétylglycine, 10,6 g d'acétate de sodium, 20 ml de 4-isopropylbenzaldéhyde et 57 ml d'anhydride acétique. On agite 30 minutes puis le mélange est agité 1 heure à 110°C puis 15 heures à température
5 ambiante. Le mélange réactionnel est versé sur 600 ml d'eau et 400 ml d'éther de pétrole préalablement chauffé à 50°C. La phase organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 2 fois 150 ml d'éther de pétrole.

Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de
10 magnésium, filtrées et concentrées sous pression réduite jusqu'à 100 ml et obtention d'un précipité. Celui-ci est filtré, lavé par 2 fois 50 ml de pentane pour donner 8,2 g de 4-(isopropylbenzylidène) 2-méthyl 5-oxazolone sous forme d'un solide jaune fondant à 77°C.

15 Exemple H

Préparation de la 4ζ-méthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 12 erlenmeyers une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 4-méthoxyphénylalanine
20 (R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 0,35 litres de moût issus de 12 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volumes de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau
25 puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans la

residu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucleosil 70 08 10x250 mm (Machery Nagele) élue dans un mélange de

60 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient
 5 12 mg de 4ζ-méthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, réf. TMS): 0,63 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H, 5 β₂), 0,96 (t, J = 7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1,17 (mt, 1H: 3 β₂), de 1,30 à 1,45 (mt, 1H: 3 γ₂), 1,38 (d, J = 7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,55 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ₁ et CH₂ 2 β), 2,05 (mt, 1H, 3 β₁), 2,20 (mt, 1H, 5 δ₂), 2,40 (d large, J = 16 Hz, 1H: 5 δ₁), 2,47 (d, J = 16 Hz, 1H: 5 β₁), 2,88 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H: 5 ε₂), 2,99 (dd, J = 12,5 et 5 Hz, 1H: 4 β₂), 3,30 (s, 3H: NCH₃ 4), 3,32 et 3,60 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3,40 (t, J = 12,5 Hz, 1H: 4 β₁), 3,80 (s, 3H: OCH₃), 4,60 (t, J = 7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,80 (dd large, J = 13 et 8,5 Hz, 1H: 5 ε₁), 4,88 (mt, 1H: 2α), 4,92 (d large, J = 10 Hz, 1H: 1α), 5,31 (dd, J = 12,5 et 5 Hz, 1H: 4 α), 5,34 (d large, J = 5,5 Hz, 1H: 5 α), 5,90 (d, J = 9 Hz, 1H: 6 α), 5,93 (q large, J = 7,5 Hz, 1H: 1β), 6,54 (d, J = 9 Hz, 1H: NH 2), 6,87 (d, J = 8 Hz, 2H: 4e), 7,16 (d, J = 8 Hz, 2H: 4δ), de 7,15 à 7,40 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,50 (mt, 2H: 1' H₅ et 1' H₄), 7,80 (dd, J = 4 et 2,5 Hz, 1H: 1' H₆), 8,43 (d, J = 10 Hz, 1H: NH 1), 8,78 (d, J = 9 Hz, 1H: NH 6), 11,65 (s, 1H: OH).

Exemple I

Préparation de la 4ζ-méthyl-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

25 On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 4-méthylphénylalanine (5 g/l) à 16 heures de culture. Les 1,8 litres de moût issus
 tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40 % d'acétonitrile
 centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis regroupées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. On obtient

- sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de
- 5 pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 49 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 6 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un
- 10 mélange de 55 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 44 mg de 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.
- 15 Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, réf. TMS): 0,52 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H, 5 β_2), 0,93 (t, J = 7,5 Hz, 3H: CH₃ 2 γ), 1,15 (mt, 1H: 3 β_2), de 1,20 à 1,40 (mt, 1H: 3 γ_2), 1,35 (d, J = 7,5 Hz, 3H: CH₃ 1 γ), de 1,50 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH₂ 2 β), 2,04 (mt, 1H, 3 β_1), 2,18 (mt, 1H, 5 δ_2), de 2,25 à 2,45 (mt, 2H: 5 δ_1 et 5 β_1),
- 20 2,36 (s, 3H: ArCH₃), 2,83 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2,99 (dd, J = 13 et 4 Hz, 1H: 4 β_2), 3,28 (s, 3H: NCH₃ 4), 3,31 et 3,59 (2 mts, 1H chacun: CH₂ 3 δ), 3,40 (t, J = 13 Hz, 1H: 4 β_1), 4,59 (t, J = 7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,74 (dd large, J = 13 et 7 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4,85 (mt, 1H: 2 α), 4,89 (d large, J = 10 Hz, 1H: 1 α), de 5,25 à 5,35 (mt, 2H: 5 α et 4 α), de 5,85 à 5,95 (mt, 2H: 6 α et 1 β), 6,52 (d, J = 9,5 Hz, 1H: NH 2), 7,14 (AB limite, J = 9 Hz, 4H: 4 δ et 4 ϵ), de 7,15 à 7,35 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,50 (mt, 2H: 1' H₄ et 1' H₅), 7,81 (dd, J = 4 et 2 Hz, 1H: 1' H₆), 8,41 (d, J = 10 Hz, 1H: NH 1), 8,74 (d, J = 9 Hz, 1H: NH 6), 11,63 (s, 1H: OH).
- 25

préparation de la 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans la soude 0,1N de 4-méthylthiophénylalanine (R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 65 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 6 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 45 mg de 4 ζ -méthylthio-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, réf. TMS): 0,68 (dd, $J = 16$ et 5,5 Hz, 1H, 5 β_2), 0,93 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 2 γ), 1,13 (mt, 1H: 3 β_2), de 1,25 à 1,40 (mt, 1H: 3 γ_2), 1,33 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 1 γ), de 1,55 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH_2 2 β), 2,02 (mt, 1H, 3 β_1), 2,18 (mt, 1H, 5 δ_2), 2,38 (d large, $J = 16,5$ Hz, 1H: 5 δ_1), 2,46 (s, 3H: SCH_3), 2,48 (d, $J = 16$ Hz, 1H, 5 β_1), 2,85 (dt, $J = 13,5$ et 4 Hz, 1H: 5 α_1), 3,00 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 4 β), 3,07 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 4 α), 3,20 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 3 α), 3,27 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 3 β), 3,30 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 2 α), 3,37 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 2 β), 3,40 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 α), 3,47 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 β), 3,50 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 γ), 3,53 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 δ), 3,56 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ϵ), 3,59 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ζ), 3,62 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 η), 3,65 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 θ), 3,68 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ι), 3,71 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 κ), 3,74 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 λ), 3,77 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 μ), 3,80 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ν), 3,83 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ξ), 3,86 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 \omicron), 3,89 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 π), 3,92 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ρ), 3,95 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 σ), 3,98 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 τ), 4,01 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 υ), 4,04 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ϕ), 4,07 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 χ), 4,10 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ψ), 4,13 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,16 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,19 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,22 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,25 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,28 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,31 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,34 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,37 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,40 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,43 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,46 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,49 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,52 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,55 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,58 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,61 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,64 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,67 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,70 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,73 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,76 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,79 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,82 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,85 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,88 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,91 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,94 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 4,97 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,00 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,03 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,06 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,09 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,12 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,15 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,18 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,21 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,24 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,27 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,30 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,33 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,36 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,39 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,42 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,45 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,48 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,51 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,54 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,57 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,60 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,63 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,66 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,69 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,72 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,75 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,78 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,81 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,84 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,87 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,90 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,93 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,96 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 5,99 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 6,02 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 6,05 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 6,08 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 6,11 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 6,14 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H: 1 ω), 6,17 (dd, $J = 12$ et 5

13,5 et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4,86 (mt, 1H: 2 α), 4,89 (dd, J = 10 et 1,5 Hz, 1H: 1 α), 5,30 (d large, J = 5,5 Hz, 1H: 5 α), 5,32 (dd, J = 12

et 1,5 Hz, 1H:1 β), 6,55 (d, J = 9,5 Hz, 1H: NH 2), 7,13 (d, J = 8 Hz, 2H: 4 δ), de 7,15 à 7,35 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,19 (d, J = 8 Hz, 2H: 4 ϵ), 7,45 (mt, 2H: 1' H₄ et 1' H₅), 7,76 (t, J = 5 Hz, 1H: 1' H₆), 8,42 (d, J = 10 Hz, 1H: NH 1), 8,76 (d, J = 9,5 Hz, 1H: NH 6),
 5 11,65 (s, 1H: OH).

La 4-méthylthiophénylalanine (RS) peut être préparée selon la méthode décrite par R.L.Colescott, R.R.Herr, J.P. Dailey J. Am. Chem. Soc, 1957, 79, 4232-4235.

Exemple K

10 Préparation de la 4 ϵ -méthylamino dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans l'eau de 3-méthylaminophénylalanine
 15 (R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau
 20 puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de
 25 pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 19 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative

fractionnement. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont combinées et évaporées. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 19 mg de 4 ϵ -méthylamino dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, réf. TMS): 0,93 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 2 γ), 1,00 (dd, $J = 16$ et 6 Hz, 1H, 5 β_2), 1,17 (mt, 1H: 3 β_2), de 1,25 à 1,40 (mt, 2H: 3 γ_2), 1,35 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 1 γ), de 1,55 à 1,80 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH_2 2 β), 2,03 (mt, 1H, 3 β_1), 2,23 (mt, 1H, 5 δ_2), 2,39 (d large, $J = 16$ Hz, 1H: 5 δ_1), 2,52 (d, $J = 16$ Hz, 1H: 5 β_1), 2,78 (s, 3H: ArNCH_3 4), 2,85 (dt, $J = 13$ et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2,99 (dd, $J = 13$ et 4,5 Hz, 1H: 4 β_2), 3,23 (s, 3H: NCH_3 4), 3,25 (t, $J = 13$ Hz, 1H: 4 β_1), 3,38 et 3,58 (2 mts, 1H chacun: CH_2 3 δ), 4,05 (mf, 1H: ArNH), 4,58 (dd, $J = 6,5$ et 7,5 Hz, 1H, 3 α), 4,76 (dd large, $J = 13$ et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4,85 (mt, 1H: 2 α), 4,87 (d large, $J = 10$ Hz, 1H: 1 α), 5,35 (dd, $J = 13$ et 4,5 Hz, 1H: 4 α), 5,38 (d large, $J = 6$ Hz, 1H: 5 α), 5,90 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H: 6 α), 5,91 (mt, 1H: 1 β), 6,36 (s large, 1H: H 2 de l'aromatique en 4), de 6,45 à 6,55 (mt, 2H: H 4 et H 6 de l'aromatique en 4), 6,53 (d, $J = 10$ Hz, 1H: NH 2), 7,12 (t, $J = 8$ Hz, 1H: H 5 de l'aromatique en 4), de 7,15 à 7,45 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,35 (mt, 2H: 1' H_4 et 1' H_5), 7,75 (t, $J = 3$ Hz, 1H: 1' H_6), 8,40 (d, $J = 10$ Hz, 1H: NH 1), 8,78 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H: NH 6), 11,60 (s, 1H: OH).

Le dichlorhydrate de 3-méthylaminophénylalanine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

En opérant comme à l'exemple F mais à partir de 1,17 g 3-méthylamino benzyl acétamidomalonate de diéthyle et 20 ml d'acide chlorhydrique 12 N, on obtient 1,03 g d'un solide jaune beige. Celui-ci est dissous dans 20 ml d'éthanol absolu et additionné de 0,4 g de noir animal. La solution est filtrée sur Clarcel, puis filtrée et concentrée sous pression réduite (50 kPa) La même opération est recommencée avec 1 g de noir animal et le solide obtenu trituré dans 20 ml d'éther. Après filtration et séchage sous pression réduite (2,7 kPa) à 50°C, on obtient 0,65 g de dichlorhydrate de 3-méthylaminophénylalanine (R,S)

Le 3-méthylaminophénylalanine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

- On place dans un tricol maintenu sous atmosphère d'azote 3,11 ml d'anhydride acétique. On ajoute ensuite en 3 minutes à 0°C, 1,51 ml d'acide formique puis on chauffe à 50°C pendant 2 heures. On laisse le mélange revenir à température ambiante en agitant pendant 3 heures
- 5 20 minutes et on ajoute 4 ml de THF anhydre sous azote et on refroidit à -20°C. On ajoute en 10 minutes, une solution de 4 g de 3-aminobenzyl acétamidomalonate de diéthyle dans un mélange de 15 ml de THF anhydre et de 15 ml de dichlorométhane anhydre. L'agitation est poursuivie 1 heure 10 minutes à -20°C puis à 20°C pendant
- 10 16 heures. Le mélange réactionnel est concentré à sec sous pression réduite (50 kPa) à 30°C, puis coévaporé avec 30 ml de toluène anhydre pour donner un solide blanc qui est dissous dans un mélange de 10 ml de THF anhydre et de 20 ml de dichloro 1,2 éthane anhydre puis placé dans un tricol sous azote.
- 15 Le mélange est refroidi à -5°C puis 1,55 ml de complexe borane-diméthylsulfure (solution 2M dans le THF) est ajouté en 10 minutes. On laisse le mélange revenir à température ambiante et la solution est chauffée 3 heures au reflux puis agitée 15 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est refroidi à 0°C puis on ajoute en
- 20 25 minutes, 10 ml de MeOH. On agite 45 minutes à 0°C puis 30 minutes à température ambiante. On refroidit à 0°C puis on fait barboter HCl gaz jusqu'à pH 2. On chauffe 1 heure à reflux puis le mélange est concentré à sec sous pression réduite à 30°C pour donner 5 g d'un produit qui est repris par 30 ml d'une solution aqueuse de NaHCO₃ et
- 25 de 30 ml de CH₂Cl₂. La phase organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 20 ml d'eau. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite (2,6 kPa) pour donner 3,43 g d'une huile jaune qui est purifiée par chromatographie flash (éluant AcOEt-cyclohexane

Le 3-amino benzyl acétamidomalonate de diéthyle peut être préparé

selon la méthode décrite par T.C. Cardno, J.N.Ward, W.H. Chapman et H. Bakoff, J. Med. Chem. 1971, 14, 1111-1114.

Example 1

Préparation de la 4 ζ -trifluorométhyl dés(4 ζ -diméthylamino) pristina-
mycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 4-trifluorométhylphénylalanine (S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 3 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 5 mg de 4 ζ -trifluorométhyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, réf. TMS): 0,86 (dd, $J = 16$ et 5,5 Hz, 1H: 5 β_2), 0,91 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 2 γ), 1,13 (mt, 1H: 3 β_2), 1,31 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 1 γ), 1,42 (mt, 1H: 3

NCH₃ 4), 3,20 et 3,31 (2 dd, respectivement J = 13 et 6 Hz et J = 13 et 10 Hz,, 1H chacun: 4 β₂ et 4 β₁), 3,42 et 3,60 (2 mts., 1H chacun:

7,5 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4,83 (mt, 1H: 2 α), 4,91 (d large, J = 10 Hz, 1H: 1 α), 5,40 (d large, J = 5,5 Hz, 1H: 5 α), 5,55 (dd, J = 10 et 6 Hz, 1H: 4 α), 5,87 (d, J = 9,5 Hz, 1H: 6 α), 5,90 (q large, J = 7,5 Hz, 1H: 1 β), 6,68 (d, J = 9,5 Hz, 1H: NH 2), de 7,15 à 7,40 (mt, 9 H: 4 δ - 5 H Aromatiques 6 - 1' H₅ et 1' H₄), 7,52 (d, J = 8 Hz, 2H: 4 ϵ), 7,68 (d, J = 4 et 1,5 Hz, 1H: 1' H₆), 8,43 (d, J = 10 Hz, 1H: NH 1), 8,76 (d, J = 9,5 Hz, 1H: NH 6), 11,70 (s, 1H: OH).

Exemple M

Préparation de la 4 ϵ -méthoxy dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine IA.

- 10 On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 5 g/l dans la soude 0,1N de 3-méthoxyphénylalanine (S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de
- 15 tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une
- 20 colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine IA sont regroupées et évaporées. On obtient 41 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 6 ml d'un mélange 60 % eau et
- 25 40 % acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine

évaporées et le résidu est repris par 6 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté en 2 fois sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine IA.

Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, réf. TMS): 0,52 (dd, $J = 16$ et 5,5 Hz, 1H, 5 β_2), 0,90 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 2 γ), de 1,10 à 1,34 (mt, 2H: 3 β_2 et 3 γ_2), 1,34 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 1 γ), de 1,50 à 1,80 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH_2 2 β), 2,04 (mt, 1H, 3 β_1), 2,20
 5 (mt, 1H, 5 δ_2), 2,35 (d large, $J = 16$ Hz, 1H: 5 δ_1), 2,38 (d, $J = 16$ Hz, 1H: 5 β_1), 2,83 (dt, $J = 13$ et 4 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2,97 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H: 4 β_2), 3,28 (s, 3H: NCH_3 4), 3,28 et 3,56 (2 mts, 1H chacun: CH_2 3 δ), 3,40 (t, $J = 12$ Hz, 1H: 4 β_1), 3,80 (s, 3H: OCH_3), 4,58 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, 3 α), 4,76 (dd large, $J = 13$ et 8 Hz, 1H: 5
 10 ϵ_1), 4,85 (mt, 1H: 2 α), 4,90 (d large, $J = 10$ Hz, 1H: 1 α), 5,27 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H: 4 α), 5,30 (d large, $J = 5,5$ Hz, 1H: 5 α), 5,89 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H: 6 α), 5,91 (q large, $J = 7,5$ Hz, 1H: 1 β), 6,51 (d, $J = 10$ Hz, 1H: NH 2), de 6,80 à 6,90 (mt, 3H: H 2 - H 4 et H 6 de l'aromatique en 4), de 7,15 à 7,40 (mt, 6H: H 5 de l'aromatique en 4
 15 et H Aromatiques 6), 7,45 (d large, $J = 9$ Hz, 1H: 1' H $_4$), 7,50 (dd, $J = 9$ et 4 Hz, 1H: 1' H $_5$), 7,80 (d large, $J = 4$ Hz, 1H: 1' H $_6$), 8,40 (d, $J = 10$ Hz, 1H: NH 1), 8,73 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H: NH 6), 11,62 (s, 1H: OH).

Exemple N

- 20 Préparation de 4 ϵ -fluoro 4 ζ -méthyl dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine IA.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 10 g/l dans la soude 0,1N de 3-fluoro
 25 4-méthylphénylalanine (R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par

évaporé, l'extract est purifié par HPLC sur dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par palliers de 0 à 10 % de

- dérivé de pristinamycine IA sont regroupées et évaporées. On obtient 15 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de
- 5 55 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 9 mg de 4 ϵ -fluoro 4 ζ -méthyl-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I A.
- 10 Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, réf. TMS): 0,60 (dd, $J = 16$ et 5,5 Hz, 1H, 5 β_2), 0,91 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 2 γ), 1,12 (mt, 1H: 3 β_2), de 1,25 à 1,35 (mt, 1H: 3 γ_2), 1,33 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H: CH_3 1 γ), de 1,50 à 1,85 (mt, 3H: 3 γ_1 et CH_2 2 β), 2,02 (mt, 1H, 3 β_1), 2,13 (mt, 1H, 5 δ_2), 2,27 (s, 3H: ArCH_3), 2,36 (d large, $J =$
- 15 16 Hz, 1H: 5 δ_1), 2,45 (d, $J = 16$ Hz, 1H: 5 β_1), 2,85 (dt, $J = 13$ et 4,5 Hz, 1H: 5 ϵ_2), 2,97 (dd, $J = 12,5$ et 4,5 Hz, 1H: 4 β_2), 3,23 (s, 3H: NCH_3 4), 3,30 et 3,56 (2 mts, 1H chacun: CH_2 3 δ), 3,37 (t, $J = 12,5$ Hz, 1H: 4 β_1), 4,55 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, 3 α), 4,75 (dd large, $J = 13$ et 8 Hz, 1H: 5 ϵ_1), 4,83 (mt, 1H: 2 α), 4,89 (d large, $J = 10$
- 20 Hz, 1H: 1 α), 5,29 (dd, $J = 12,5$ et 4,5 Hz, 1H: 4 α), 5,32 (d large, $J = 5,5$ Hz, 1H: 5 α), 5,89 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H: 6 α), 5,92 (mt, 1H: 1 β), 6,49 (d, $J = 10$ Hz, 1H: NH 2), 6,90 (mt, 2H: H 2 et H 6 de l'aromatique en 4), 7,11 (t, $J = 8$ Hz, 1H: H 5 de l'aromatique en 4), de 7,10 à 7,30 (mt, 5H: H Aromatiques 6), 7,43 (dd, $J = 8,5$ et 1 Hz,
- 25 1H: 1' H_4), 7,49 (dd, $J = 8,5$ et 4,5 Hz, 1H: 1' H_5), 7,75 (dd, $J = 4,5$ et 1 Hz, 1H: 1' H_6), 8,48 (d, $J = 10$ Hz, 1H: NH 1), 8,70 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H: NH 6), 11,60 (s, 1H: OH).

Le chlorhydrate de 3-fluoro 4-méthylphénylalanine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

On ajoute à 1 g de 3-fluoro 4-méthylphénylalanine 10 ml d'eau et 10 ml d'acétone et on chauffe au reflux sous agitation pendant 8 heures. Après une nuit à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré à sec sous pression réduite. On reprend le résidu par 10 ml d'eau et 10 ml d'acétone et on chauffe au reflux sous agitation pendant 8 heures.

et d'éthanol, puis à nouveau concentré à sec. Après séchage sous pression réduite (2,6 kPa), on obtient 0,6 g de chlorhydrate de 3-fluoro 4-méthyl phénylalanine (R,S) sous forme de cristaux blancs fondant à une température supérieure à 260°C.

- 5 Le N-acétyl (3-fluoro-4 méthyl) phénylalaninate de méthyle (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

- A 1,9 g de (4-méthyl 3-fluoro) 2-acétamido cinnamate de méthyle placé sous atmosphère d'azote dans un autoclave, on ajoute 0,2 g de palladium sur charbon à 10 % dans 230 ml d'éthanol absolu. Le mélange
10 est placé sous une pression de 5,5 bars d'hydrogène et chauffé 15 heures à 50°C sous agitation. Après stabilisation de la température à 26°C et remise à pression atmosphérique, le mélange réactionnel est filtré sur Clarcel®, rincé à l'éthanol puis concentré à sec sous sous pression réduite (2,6 kPa). On obtient
15 1,6 g de N-acétyl (3-fluoro-4 méthyl) phénylalaninate de méthyle sous forme d'une huile incolore (Silice Merck 5719, Rf= 0,46; éluant CH₂Cl₂/AcOEt 50/50).

Le (3-fluoro 4-méthyl) 2-acétamido cinnamate de méthyle peut être préparé de la manière suivante :

- 20 Dans un tricol placé sous azote on ajoute 3,6 g de 2-acétamido acrylate de méthyle, 0,12 g d'acétate de palladium, 5,2 g de chlorure de tétrabutyl ammonium et 3,8 g d'hydrogénocarbonate de sodium puis on additionne à ce mélange 4 g de 2-fluoro 4-bromo toluène en solution dans 120 ml de DMF anhydre. Le mélange est chauffé 16 heures
25 30 minutes à 82°C puis après refroidissement versé sur 1000 ml d'eau distillée. Le mélange est repris par 250 ml de CH₂Cl₂, la phase organique est décantée et la phase aqueuse lavée par 2 fois 250 ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont agglomées, séchées sur sulfate de sodium anhydre, concentrées à sec sous pression réduite (2,6 kPa) et le résidu est purifié par chromatographie (éluant AcOEt/cyclohexane puis AcOEt pur). On obtient 2,6 g de (3-fluoro 4-méthyl) 2-acétamido cinnamate de méthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 263°C.

Exemple 0

Préparation de la 4ε-éthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple F une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec
 5 ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,2N de chlorhydrate de 3-O-éthyltyrosine (R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait
 10 par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à
 15 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. On obtient 19 mg de résidu sec. Celui-ci est repris par 3 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée
 20 dans un mélange de 60 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 15,8 mg de 4ε-O-éthoxy-dés(4ζ-diméthylamino)
 25 pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS)

0,55 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,90 (t, J = 7,5

en 3 γ) ; 1,63 et 1,73 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 β) ; 2,22 et 2,33 (respectivement mt et d

1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,83 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 2,95 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; 3,22 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 δ) ; 3,27 (s, 3H : NCH₃) ; 3,39 (t, J = 12 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 4 β) ; 3,53 (mt, 1H : l'autre H du CH₂ en 3 δ) ; 3,93 et 4,03 (2 mts, 1H chacun : OCH₂ de l'éthyle) ; 4,56 (dd, J = 7 et 5,5 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, J = 13 et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 ε) ; 4,82 (mt, 1H : 2 α) ; 4,88 (dd, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,23 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,23 (d large, J = 5,5 Hz, 1H : 5 α) ; 5,87 (d, J = 9,5 Hz, 1H : 6 α) ; 5,92 (mt, 1H : 1 β) ; 6,47 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,80 (mt, 3H : H Aromatiques en ortho et en para de l'éthoxy) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 6H : H Aromatiques en 6 et H Aromatiques en méta de l'éthoxy) ; 7,43 (dd, J = 8 et 1 Hz, 1H : 1' H₄) ; 7,50 (dd, J = 8 et 4 Hz, 1H : 1' H₅) ; 7,77 (dd, J = 4 et 1 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,70 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,60 (s, 1H : OH).

Le chlorhydrate de 3-O-éthyltyrosine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

On place dans un ballon 1 g de N-tert.butoxycarbonyl 3-éthoxy phénylalanine (R,S) en solution dans 3,6 ml de dioxanne chlorhydrique puis le mélange est agité 5 heures à température ambiante. Le précipité formé est filtré, rincé par du dioxanne puis à l'éther puis séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C pour donner 0,65 g de chlorhydrate de 3-O-éthyltyrosine (R,S) sous forme d'un solide blanc fondant à 200°C.

Le N-tert.butoxycarbonyl 3-éthoxy phénylalanine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

On place dans un ballon 1,23 g de N-tert.butoxycarbonyl 3-éthoxy phénylalanine (R,S) en solution dans 3,6 ml de dioxanne chlorhydrique puis le mélange est agité 5 heures à température ambiante. Le précipité formé est filtré, rincé par du dioxanne puis à l'éther puis séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C pour donner 0,65 g de chlorhydrate de 3-O-éthyltyrosine (R,S) sous forme d'un solide blanc fondant à 200°C.

Le chlorhydrate de 3-O-éthyltyrosine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :
On place dans un ballon 1,23 g de N-tert.butoxycarbonyl 3-éthoxy phénylalanine (R,S) en solution dans 3,6 ml de dioxanne chlorhydrique puis le mélange est agité 5 heures à température ambiante, le mélange est évaporé sous pression réduite, puis acidifié par 8,56 ml d'acide chlorhydrique 1N. Le produit est extrait par 3 fois 10 ml d'acétate d'éthyle. Le produit est séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C pour donner 0,65 g de chlorhydrate de 3-O-éthyltyrosine (R,S) sous forme d'un solide blanc fondant à 200°C.

lavées par 2 fois 10 ml d'eau, séchées filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite pour donner 1 g de N-tert.butoxy carbonyl 3-éthoxy phénylalanine (R,S) sous forme d'une huile jaune (Silice Merck 5719, Rf = 0,7, éluant : toluène 80 / MeOH 10 / diéthylamine 10).

Le N-tert.butoxycarbonyl 3-éthoxy phénylalaninate d'éthyle (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

On place dans un tricol sous atmosphère d'azote, 1,5 g de N-tert.butoxycarbonyl 3-tyrosine (R,S) en solution dans 7,5 ml de diméthylformamide sec puis on ajoute, 0,508 g d'hydruure de sodium à 50 % dans l'huile. Après 2 heures d'agitation à température ambiante on ajoute 0,86 ml de iodoéthane puis le mélange est agité 4 heures à température ambiante. Le milieu est filtré, le solide résultant lavé par 3 fois 10 ml d'eau puis 2 fois 10 ml d'éther de pétrole pour donner après séchage sous pression réduite (2,7 kPa) à 30°C, 1,33 g de N-tert.butoxycarbonyl 3-éthoxy phénylalaninate d'éthyle (R,S) sous forme d'un solide blanc.

La N-tert.butoxycarbonyl 3-tyrosine (R,S) peut être préparée de la manière suivante :

On place sous agitation dans un tricol, 18 g de 3-tyrosine (R,S) en solution dans 180 ml de dioxanne puis on ajoute 99 ml de soude 1N puis 26 g de di-tert.butyl dicarbonate en solution dans 160 ml de dioxanne. Après 36 heures d'agitation le milieu est concentré sous pression réduite à 30°C, repris avec 100 ml d'eau distillée, acidifié avec de l'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH 5 puis extrait par 2 fois 200 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée à sec sous pression réduite à 30°C, pour donner 26 g de N-tert.butoxycarbonyl 3-tyrosine (R,S) sous forme d'un solide blanc.

toluène 80 / MeOH 10 / diéthylamine 10

Exemple P

repartir à 10 g de 40 g de 3-tyrosine (R,S) en solution dans 400 ml de dioxanne

On réalise à l'échelle de 90 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple F une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans l'acide chlorhydrique 0,1N de chlorhydrate de 4-O-éthyltyrosine (S). Au terme de 40 heures de culture, les 2,7 litres de moût issus de 90 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ-éthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 52 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 48 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4ζ-éthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 29 mg de 4ζ-éthoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

25 Spectre de R.M.N. ¹ H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm, ref. TMS)

0,64 (dd, J = 16 et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,12 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; 1,25 (mt, 1H : 1H du CH₂ en 3 γ) ; 1,33 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 1 γ) ; 1,42 (t, J = 7 Hz, 3H : CH₃ de l'éthyle) ; 1,57 (mt, 1H : l'autre H du CH₂

2,12 (t, J = 6 Hz, 2H : 2H du CH₂ en 4 β) ; 2,22 (t, J = 6 Hz, 1H : l'autre H du CH₂ en 5 β) ; 2,83 (dt, J = 13 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 ε) ; 2,93 (dd, J = 12 et 4 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 4 β) ; de

(t, $J = 12$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 4 β) ; 3,55 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 δ) ; 3,95 (AB limite, 2H : OCH_2 de l'éthyle) ; 4,56 (dd, $J = 7,5$ et 6 Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, $J = 13$ et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,87 (dd, $J = 10$ et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,26 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large, $J = 5,5$ Hz, 1H : 5 α) ; 5,88 (d, $J = 10$ Hz, 1H : 6 α) ; 5,92 (mt, 1H : 1 β) ; 6,48 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH en 2) ; 6,83 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ϵ) ; 7,10 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,44 (dd, $J = 8,5$ et 1,5 Hz, 1H : 1' H_4) ; 7,57 (dd, $J = 8,5$ et 4,5 Hz, 1H : 1' H_5) ; 7,77 (dd, $J = 4,5$ et 1,5 Hz, 1H : 1' H_6) ; 8,38 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH en 1) ; 8,75 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH en 6) ; 11,60 (s, 1H : OH).

Le chlorhydrate de 4-O-éthyltyrosine (S) peut être synthétisé comme décrit par Y. Sasaki et coll, Chem. Pharm. Bull., 30, 4435 (1982).

Exemple Q

Préparation de la 4 ζ -allyloxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 90 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple F une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans l'acide chlorhydrique 0,1N de chlorhydrate de 4-O-allyltyrosine (S). Au terme de 40 heures de culture, les 2,7 litres de moût issus de 90 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait

est traité par 2 volumes de dichlorométhane. Les fractions contenant la 4 ζ -allyloxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu est repris par 1 ml d'acétonitrile.

acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7 μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 52 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 48 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4 ζ -allyloxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A sont
 5 regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 29 mg de 4 ζ -allyloxy-dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, ref. TMS)

- 10 0,63 (dd, $J = 16$ et 6 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5 β) ; 0,91 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H : CH_3 en 2 γ) ; 1,13 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 β) ; 1,29 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 γ) ; 1,33 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H : CH_3 en 1 γ) ; 1,57 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 γ) ; 1,65 et 1,74 (2 mts, 1H chacun : CH_2 , en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 β) ; 2,14 et 2,34
 15 (respectivement mt et d large, $J = 16,5$ Hz, 1H chacun : CH_2 en 5 δ) ; 2,43 (d, $J = 16$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5 β) ; 2,85 (dt, $J = 13$ et 4 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5 ϵ) ; 2,95 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 4 β) ; 3,25 (s, 3H : NCH_3) ; 3,33 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 δ) ; 3,36 (t, $J = 12$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 4 β) ; 3,56 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 δ) ; 4,51 (AB limite, 2H : OCH_2 de l'allyle) ; 4,56 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, $J = 13$ et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,88 (dd, $J = 10$ et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,27 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large, $J = 6$ Hz, 1H : 5 α) ; 5,30 et 5,40
 20 (respectivement mt et dd, $J = 17$ et $1,5$ Hz, 1H chacun : $=\text{CH}_2$ de l'allyle) ; 5,89 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H : 6 α) ; 5,91 (mt, 1H : 1 β) ; 6,02 (mt, 1H : $\text{CH}=\text{}$ de l'allyle) ; 6,50 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH en 2) ; 6,85 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ϵ) ; 7,12 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques

11,63 (s, 1H : OH).

Le chlorhydrate de 4-O-allyltyrosine (S) peut être synthétisé comme décrit par A. Loffet, H. Zang, Int. J. Pept. Protein Res. ,42, 346 (1993).

Exemple R

5 Préparation de la 4ζ-éthylamino-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 50 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple F une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de dichlorhydrate de 4-éthylaminophénylalanine (R,S). Au terme de 10 40 heures de culture, les 1,5 litres de moût issus de 50 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases 15 chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 20 4ζ-éthylamino-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 65 % eau et 35 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40 % d'acétonitrile. Les 25 fractions contenant la 4ζ-éthylamino-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 10 mg de 4ζ-éthylamino-

Structure chimique de la 4ζ-éthylamino-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A

0,72 (dd, J = 16 et 6 Hz, 1H : 1H du CH₂ en 5 β) ; 0,90 (t, J = 7,5 Hz, 3H : CH₃ en 2 γ) ; 1,15 (m, 1H : 1H du CH₂ en 3 β) ; de 1,20 à 4,00 (m, 12H : 12H des autres protons de la molécule).

- 1'éthyle) ; 1,33 (d, $J = 7$ Hz, 3H : CH_3 en 1 γ) ; de 1,50 à 1,65 (mt, 1H : 1'autre H du CH_2 en 3 γ) ; 1,60 et 1,74 (2 mts, 1H chacun : CH_2 en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : 1'autre H du CH_2 en 3 β) ; 2,21 et 2,33 (respectivement mt et d large, $J = 16,5$ Hz, 1H chacun : CH_2 en 5 δ) ;
- 5 2,40 (d, $J = 16$ Hz, 1H : 1'autre H du CH_2 en 5 β) ; 2,82 (dt, $J = 13$ et 4,5 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5 ϵ) ; 2,89 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 4 β) ; 3,10 (mt, 2H : NCH_2 de 1'éthyle) ; de 3,20 à 3,35 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 δ) ; 3,26 (s, 3H : NCH_3) ; 3,31 (t, $J = 12$ Hz, 1H : 1'autre H du CH_2 en 4 β) ; 3,54 (mt, 1H : 1'autre H du CH_2 en 3 δ) ; 3,67 (mf, 1H : NH) ; 4,56 (dd, $J = 6,5$ et 7 Hz, 1H : 3 α) ;
- 10 4,75 (dd large, $J = 13$ et 8 Hz, 1H : 1'autre H du CH_2 en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,90 (d large, $J = 10$ Hz, 1H : 1 α) ; 5,24 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large, $J = 6$ Hz, 1H : 5 α) ; 5,88 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H : 6 α) ; 5,90 (mt, 1H : 1 β) ; 6,52 (d, $J = 8$ Hz, 3H : NH en 2 et H Aromatiques en 4 ϵ) ; 7,00 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,46 (AB limite, 2H : 1' H_4 et 1' H_5) ; 7,84 (dd, $J = 4$ et 1 Hz, 1H : 1' H_6) ; 8,45 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH en 1) ; 8,77 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H : NH en 6) ; 11,65 (s, 1H : OH).
- 15
- 20 Le dichlorhydrate de 4-éthylaminophénylalanine (R,S) peut être préparé selon la méthode décrite par F. Bergel, J.A. Stock, J. Chem. Soc, 90-97 (1959).

Exemple S

- Préparation de la 4 ζ -trifluorométhoxy dés(4 ζ -diméthylamino)
- 25 pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple F une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec

Les milieux de culture sont extraits de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 volumes de chloroforme. Les phases

chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par du dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ-trifluorométhoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 60 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 40 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4ζ-trifluorométhoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 46,5 mg de 4ζ-trifluorométhoxy-dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, ref. TMS)

0,77 (dd, $J = 16$ et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5 β) ; 0,92 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H : CH_3 en 2 γ) ; 1,08 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 β) ; de 1,30 à 1,40 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 γ) ; 1,33 (d, $J = 7$ Hz, 3H : CH_3 en 1 γ) ; de 1,55 à 1,70 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 γ) ; 1,65 et 1,76 (2 mts, 1H chacun : CH_2 en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 β) ; 2,11 et 2,40 (respectivement mt et d large, $J = 16,5$ Hz, 1H chacun : CH_2 en 5 δ) ; 2,54 (d, $J = 16$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5 β) ; 2,88 (dt, $J = 13$ et 4 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5 ϵ) ; 3,08 (dd, $J = 12$ et 5 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 4 β) ; 3,22 (s, 3H : NCH_3) ; de 3,30 à 3,45 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 δ) ; 3,39 (t, $J = 12$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 4 β) ; 3,59 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 δ) ; 4,53 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H : 3 α) ; 4,75 (dd large, $J = 13$ et 8 Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5 ϵ) ; 4,85 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, $J = 10$ et 1,5 Hz,

δ : 6,53 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 2) ; de 7,15 à 7,35 (m, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,16 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 et 8) ; 7,26 (d, J = 8 Hz, 2H : H Aromatiques en 4 et 8) ; 7,37 (dd, J = 9,5 et 3 Hz, 1H : NH en 2) ; 7,40 (dd, J = 9,5 et 3 Hz, 1H : NH en 2) ; 7,44 (dd, J = 9,5 et 3 Hz, 1H : NH en 2).

(dd, $J = 4$ et $1,5$ Hz, $1H : 1' H_6$) ; $8,37$ (d, $J = 10$ Hz, $1H : NH$ en 1) ; $8,75$ (d, $J = 10$ Hz, $1H : NH$ en 6) ; $11,66$ (s, $1H : OH$).

Le chlorhydrate de 4-O-trifluorométhyltyrosine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

- 5 En opérant comme à l'exemple N mais à partir de 3 g de N-acétyl (4-trifluorométhoxy) phénylalaninate de méthyle et de 30 ml d'acide chlorhydrique $12N$, on obtient $1,5$ g de chlorhydrate de 4-O-trifluorométhyltyrosine (RS) sous forme de cristaux blancs fondant à $260^{\circ}C$.

- 10 Le N-acétyl (4-trifluorométhoxy) phénylalaninate de méthyle (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

- En opérant comme à l'exemple N, mais à partir de $3,1$ g de (4-trifluorométhoxy) 2-acétamido cinnamate de méthyle, de $0,3$ g de palladium sur charbon à 10% dans 50 ml d'éthanol, on obtient 3 g de N-acétyl (4-trifluorométhoxy) phénylalaninate de méthyle sous forme
15 d'un solide blanc fondant à $80^{\circ}C$.

Le 4-trifluorométhoxy 2-acétamido cinnamate de méthyle peut être préparé de la manière suivante :

- En opérant comme à l'exemple N, mais à partir de $4,3$ g de 2-acétamido acrylate de méthyle, $0,14$ g d'acétate de palladium, $6,1$ g de chlorure
20 de tétrabutyl ammonium, de $4,6$ g d'hydrogénocarbonate de sodium et de 5 g de 4-trifluorométhoxy bromo benzène en solution dans 150 ml de diméthylformamide anhydre. On obtient $3,1$ g de (4-trifluorométhoxy) 2-acétamido cinnamate de méthyle sous forme d'un solide blanc fondant à $135^{\circ}C$.

- 25 Exemple T

On réalise à l'échelle de 56 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple F une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec

de chlorhydrate de 3-méthylthiophénylalanine (R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,68 litres de moût issus de 56 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le nouveau dérivé de pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 54 % eau et 46 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 55 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 45 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la nouvelle pristinamycine sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 20 mg de 4ε-méthylthio-dés (4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

20 Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, ref. TMS)

0,56 (dd, $J = 16$ et 5,5 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5 β) ; 0,90 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H : CH_3 en 2 γ) ; 1,13 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 β) ; 1,28 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 γ) ; 1,32 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H : CH_3 en 1 γ) ; 1,58 (mt, 1H : 1'autre H du CH_2 en 3 γ) ; 1,62 et 1,74 (2 mts, 1H chacun : CH_2 en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : 1'autre H du CH_2 en 3 β) ; 2,25 et 2,35 (respectivement mt et d large, $J = 16,5$ Hz, 1H chacun : CH_2 en 5 δ) ; 2,39 (d, $J = 16$ Hz, 1H : 1'autre H du CH_2 en 5 β) ; 2,43 (s, 3H : SCH_3) ; 2,82 (dt, $J = 13$ et 4 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5 ϵ) ; 2,98 (dd, $J = 12$ et 4,5 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 4 β) ; 3,26 (s, 3H : NCH_3) ; 3,30

J = 7,5 Hz, 1H : 3 α ; 4, 4 (dd large, J = 10 et 1 Hz, 1H : 1 autre
H du CH₂ en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, J = 10 et 1 Hz,
1H : 1 α) ; 5,29 (dd, J = 12 et 4,5 Hz, 1H : 4 α) ; 5,32 (d large,

1H : 1 β) ; 6,51 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 2) ; 6,99 (d large, J = 8 Hz, 1H : H Aromatique en para du méthylthio) ; 7,10 et 7,15 (respectivement s large et d large, J = 8 Hz, 1H chacun : H Aromatiques en ortho du méthylthio) ; de 7,15 à 7,35 (mt, 6H : H Aromatiques en 6 et H Aromatiques en méta du méthylthio) ; 7,43 (d large, J = 8 Hz, 1H : 1' H₄) ; 7,52 (dd, J = 8 et 4 Hz, 1H : 1' H₅) ; 7,79 (d large, J = 4 Hz, 1H : 1' H₆) ; 8,38 (d, J = 10 Hz, 1H : NH en 1) ; 8,73 (d, J = 9,5 Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

Le chlorhydrate de 3-méthylthiophénylalanine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

En opérant comme à l'exemple N, mais à partir de 3,3 g de N-acétyl 3-méthylthio phénylalaninate de méthyle et de 40 ml d'acide chlorhydrique 12N, on obtient 1,38 g de chlorhydrate de 3-méthylthio phénylalanine (RS) sous forme de cristaux blancs fondant à 190°C.

Le N-acétyl 3-méthylthio phénylalaninate de méthyle (RS) peut être préparé de la manière suivante :

On place dans un ballon 3,72 g de 3-méthylthio 2-acétamido cinnamate de méthyle en solution dans 100 ml de méthanol et 30 ml de tétrahydrofuranne puis on ajoute 1,4 g de magnésium. Après 20 minutes de réaction on refroidit le mélange par un bain de glace puis on ajoute à nouveau 1,4 g de magnésium. Le mélange est agité à température ambiante pendant 18 heures, versé sur 1,4 l d'eau distillée et 300 ml de CH₂Cl₂ puis filtré sur Clarcel®. La phase aqueuse est ajustée à pH 6 par addition d'acide chlorhydrique 12 N puis décantée et lavée par 100 ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite pour donner 3,42 g de N-acétyl 3-méthylthio phénylalaninate de méthyle.

Le 3-méthylthio 2-acétamido cinnamate de méthyle peut être préparé de la manière suivante :

En opérant comme à l'exemple N, mais à partir de 5,6 g de 2-acétamido acrylate de méthyle, 0,18 g d'acétate de palladium, 8,2 g de chlorure de tétrabutyl ammonium, de 5,86 g d'hydrogénocarbonate de sodium et de 6,5 g de 3-iodo 1-méthylthiobenzène en solution dans 160 ml de diméthylformamide anhydre, on obtient 4,8 g de (3-méthylthio) 2-acétamido cinnamate de méthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 139°C.

Exemple U

Préparation de la 4ζ-(allyl éthyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 26 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple F une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de dichlorhydrate de 4-(allyl éthyl amino)phényl alanine (R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 0,78 litre de moût issus de 26 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ-(allyl éthyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 7 ml d'un mélange 60 % eau et 40 % acétonitrile et injecté sur une colonne semi-préparative Nucléosil 7μ C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 52 % de tampon

phosphate 100 mM pH 2,9 et 48 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées. Le résidu sec est repris par 20 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 20 mg de 4ζ-(allyl éthyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A.

Spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm, ref. TMS)

0,58 (dd, $J = 16$ et 6 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5β) ; 0,91 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H : CH_3 en 2γ) ; 1,16 (t, $J = 7$ Hz, 3H : CH_3 de l'éthyle) ; 1,16 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3β) ; 1,25 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3γ) ;
 5 1,32 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H : CH_3 en 1γ) ; 1,54 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3γ) ; 1,63 et 1,75 (2 mts, 1H chacun : CH_2 en 2β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3β) ; 2,23 et 2,31 (respectivement mt et d large, $J = 16,5$ Hz, 1H chacun : CH_2 en 5δ) ; 2,37 (d, $J = 16$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5β) ; 2,80 (dt, $J = 13$ et $4,5$ Hz, 1H :
 10 1H du CH_2 en 5ϵ) ; 2,87 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 4β) ; de 3,15 à 3,30 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3δ) ; 3,26 (s, 3H : NCH_3) ; 3,30 (t, $J = 12$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 4β) ; 3,36 (mt, 2H : NCH_2 de l'éthyle) ; 3,54 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3δ) ; 3,90 (AB limite, 2H : NCH_2 de l'allyle) ; 4,57 (dd, $J = 8$ et 6 Hz,
 15 1H : 3α) ; 4,76 (dd large, $J = 13$ et $7,5$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2α) ; 4,89 (dd, $J = 10$ et 1 Hz, 1H : 1α) ; de 5,05 à 5,20 (mt, 3H : 4α et $=\text{CH}_2$ de l'allyle) ; 5,27 (d large, $J = 6$ Hz, 1H : 5α) ; 5,83 (mt, 1H : $\text{CH}=\text{}$ de l'allyle) ; 5,88 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H : 6α) ; 5,91 (mt, 1H : 1β) ; 6,50 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH
 20 en 2) ; 6,60 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4ϵ) ; 7,02 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,47 (AB limite, 2H : $1'\text{H}_4$ et $1'\text{H}_5$) ; 7,88 (dd, $J = 4$ et 2 Hz, 1H : $1'\text{H}_6$) ; 8,41 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH en 1) ; 8,75 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

25 Le dichlorhydrate de 4-(allyl éthyl amino)phényl alanine (R,S) peut être préparé de la manière suivante :

En opérant comme à l'exemple F mais à partir de 4,54 g de 4-allyl éthylbenzyl acétamido malonate de diéthyle et de 37,9 ml d'acide

dichlorhydrate de 4-allyl éthyl amino phényl alanine (R,S) on obtient un solide brun fondant vers 130°C (décomposition).

Le 4-(allyl éthyl amino)benzyl acétamido malonate de diéthyle peut être préparé de la manière suivante :

En opérant comme à l'exemple F mais à partir de 8 g de 4-éthylaminobenzylacétamido malonate de diéthyle, 4 ml de bromure d'allyle, 5,82 ml de 1,5-diazabicyclo[4-3-0]non-5-ène, dans 50 ml de tétrahydrofurane, on obtient après purification par chromatographie flash (éluant CH_2Cl_2 / AcOEt 90-10 en volume) 5,6 g d'un solide qui est recristallisé dans 35 ml de cyclohexane. On obtient ainsi 5,43 g de 4-(allyl éthyl amino)benzyl acétamido malonate de diéthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 86°C.

Exemple V

Préparation de la 4ζ-(éthyl propyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A

On réalise à l'échelle de 60 erlenmeyers comme décrit dans l'exemple F une culture de la souche SP92::pVRC508 en milieu de production avec ajout à 16 heures de 1 ml d'une solution à 20 g/l dans la soude 0,1N de dichlorhydrate de 4-(éthyl propyl amino)phényl alanine (R,S). Au terme de 40 heures de culture, les 1,8 litres de moût issus de 60 erlenmeyers sont extraits par 2 volumes d'un mélange de 66 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 34 % d'acétonitrile, puis centrifugés. Le surnageant est extrait par 2 fois 0,5 volume de dichlorométhane. Les phases chlorométhyléniques sont lavées à l'eau puis combinées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. L'extrait sec est repris par 20 ml de dichlorométhane et injecté sur une colonne de silice (30 g) montée dans le dichlorométhane et éluée successivement par paliers de 0 à 10 % de méthanol dans le dichlorométhane. Les fractions contenant la 4ζ-(éthyl propyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées.

Le produit est purifié sur une colonne de silice (C8 10x250 mm (Macherey Nagel) éluée dans un mélange de 63 % de tampon phosphate 100 mM pH 2,9 et 37 % d'acétonitrile. Les fractions contenant la 4ζ-(éthyl propyl amino) dés(4ζ-diméthylamino) pristinamycine I_A sont regroupées et évaporées.

mycine I_A sont regroupées et extraites par un volume de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée. On obtient 16 mg de 4 ζ -(éthyl propyl amino) dés(4 ζ -diméthylamino) pristinamycine I_A .

5 Spectre de R.M.N. 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm, ref. TMS)

0,67 (dd, $J = 16$ et 6 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 5 β) ; 0,91 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H : CH_3 en 2 γ) ; 0,95 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H : CH_3 du propyle) ; 1,14 (t, $J = 7$ Hz, 3H : CH_3 de l'éthyle) ; 1,15 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 β) ; 1,25 (mt, 1H : 1H du CH_2 en 3 γ) ; 1,33 (d, $J = 7$ Hz, 3H : 10 CH_3 en 1 γ) ; de 1,45 à 1,65 (mt, 3H : l'autre H du CH_2 en 3 γ et CH_2 propyle) ; 1,63 et 1,75 (2 mts, 1H chacun : CH_2 en 2 β) ; 2,02 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 β) ; 2,23 et 2,33 (respectivement mt et d large, $J = 16,5$ Hz, 1H chacun : CH_2 en 5 δ) ; 2,37 (d, $J = 16$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5 β) ; 2,80 (dt, $J = 13$ et 5 Hz, 1H : 1H du 15 CH_2 en 5 ϵ) ; 2,89 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H : 1H du CH_2 en 4 β) ; de 3,10 à 3,25 (mt, 3H : 1H du CH_2 en 3 δ et NCH_2 du propyle) ; 3,26 (s, 3H : NCH_3) ; de 3,25 à 3,40 (mt, 2H : NCH_2 de l'éthyle) ; 3,34 (t, $J = 12$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 4 β) ; 3,54 (mt, 1H : l'autre H du CH_2 en 3 δ) ; 4,57 (dd, $J = 7,5$ et 6 Hz, 1H : 3 α) ; 4,76 (dd 20 large, $J = 13$ et $7,5$ Hz, 1H : l'autre H du CH_2 en 5 ϵ) ; 4,84 (mt, 1H : 2 α) ; 4,89 (dd, $J = 10$ et 1 Hz, 1H : 1 α) ; 5,21 (dd, $J = 12$ et 4 Hz, 1H : 4 α) ; 5,28 (d large, $J = 6$ Hz, 1H : 5 α) ; 5,88 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H : 6 α) ; 5,91 (mt, 1H : 1 β) ; 6,48 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH en 2) ; 6,60 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4 ϵ) ; 7,03 25 (d, $J = 8$ Hz, 2H : H Aromatiques en 4 δ) ; de 7,10 à 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques en 6) ; 7,47 (AB limite, 2H : 1' H_4 et 1' H_5) ; 7,89 (mt, 1H : 1' H_6) ; 8,42 (d, $J = 10$ Hz, 1H : NH en 1) ; 8,76 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H : NH en 6) ; 11,62 (s, 1H : OH).

En opérant comme à l'exemple F mais à partir de 2,5 g de 4-éthyl propylaminobenzyl acétamido malonate de diéthyle et de 21 ml d'acide chlorhydrique à 10N, on obtient après évaporation du solvant :

séché sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 2 g (97 %) de dichlorhydrate de 4-(éthyl propyl amino)phényl alanine (RS) sous forme d'un solide blanc fondant vers 147°C (décomposition).

Le 4-(éthyl propyl amino)benzyl acétamido malonate de diéthyle peut
5 être préparé de la manière suivante :

En opérant comme à l'exemple F mais à partir de 10 g de 4-éthylaminobenzylacétamido malonate de diéthyle, 5,6 ml de 1-iodo propane, 7,2 ml de 1,5-diazabicyclo[4-3-0]non-5-ène, dans 70 ml de tétrahydrofurane, on obtient après 36 heures de réaction puis
10 purification par chromatographie flash (éluant CH₂Cl₂ / MeOH 97-3 en volume), 2,8 g d'un solide qui est recristallisé dans 26 ml de cyclohexane. On obtient ainsi 2,9 g de 4-(éthyl propyl amino)benzyl acétamido malonate de diéthyle sous forme d'un solide blanc fondant à 84-86°C.

15 SEPARATION ET PURIFICATION DE COMPOSANTES DU GROUPE B :

Exemple W

30 kg de pristinamycine brute [pristinamycine IA (PIA) : 20,7 %, pristinamycine IB (PIB) : 3,9 %, pristinamycine IC (PIC) : 0,6 %, pristinamycine ID (PID) : 0,3 %, pristinamycine IIB (PIIB) : 8 %, pristinamycine IIA (PIIA) : 45 %, pristinamycine IIF (PIIF) : < 0,5 %
20 (non dosé), pristinamycine IIG (PIIG) : < 0,5 % (non dosé)] sont mis en suspension dans 210 litres d'acétate d'éthyle et agités pendant 15 heures à température ambiante. La suspension est filtrée et le filtrat acétate d'éthyle recueilli est extrait par 2 fois 20 litres
25 d'acide sulfurique 1N puis 20 litres d'eau distillée. Les phases aqueuses réunies sont lavées par 6 fois 15 litres d'acétate d'éthyle, puis ajustées à pH 7 par addition de 30 litres d'une solution à 10 %

30 lavées par 10 litres d'eau distillée. Le chlorure de méthylène est ensuite distillé et remplacé par 50 litres d'éthanol. Le mélange est alors traité au reflux par 5 à 8 kg de noir L38 pendant 30 minutes. Après filtration, le résidu est lavé avec 10 litres d'éthanol. Le résidu est

est refroidi jusqu'à 10°C en 15 heures. Après maintien une heure à 10°C, la suspension est filtrée et lavée par 3 fois 7 litres d'éthanol. Après séchage du solide à 40°C sous pression réduite, on obtient 5,7 kg de pristinamycine I purifiée (ci-après appelée PI).

5 Titre: 96,8 % (PIA : 81,1 %, PIB : 12 %, PIC : 2,6 %, PID : 1,1 %);

Rendement en PIA : 74 %.

1500 g de PI purifiée sont repris par 9 litres de dichloro-1,2 éthane puis additionnés de 1,5 équivalent d'anhydride succinique et de 0,015 équivalent de diméthylaminopyridine. La solution est maintenue
10 1 semaine à 20°C, puis introduite sur une colonne contenant 10 kg de silice (20-45 µm) [hauteur de la colonne : 1 m ; diamètre : 20 cm]. L'élution est effectuée par percolation d'un mélange dichloro-1,2 éthane/méthanol à un débit de 18 litres/heure pendant 6 heures ; le pourcentage de méthanol (à 5 % de teneur en eau) est augmenté de 0
15 à 4 % au cours de la chromatographie. 47 fractions de 2,4 litres sont récupérées.

Les fractions 5 à 15 sont réunies, le dichloro-1,2 éthane est évaporé et remplacé par 5 litres d'éthanol. Après cristallisation, on obtient 365 g de PIA titrant 99,8 %.

20 PREPARATION DE COMPOSANTES BRUTES DU GROUPE A :

Exemple X

500 g de pristinamycine brute [pristinamycine IA (PIA) : 20,7 %, pristinamycine IB (PIB) : 3,9 %, pristinamycine IC (PIC) : 0,6 %, pristinamycine ID (PID) : 0,3 %, pristinamycine IIB (PIIB) : 8 %, pristinamycine IIA (PIIA) : 45 %] sont mis en solution dans 50 litres
25 de méthylisobutylcétone. Cette solution est traitée par 50 litres de méthylisobutylcétone.

La solution obtenue est traitée par 50 litres de méthylisobutylcétone est ensuite traitée par 7,5 litres d'une solution
30 aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 35 g/litre, puis lavée par

5 litres d'eau. A chaque fois, la phase aqueuse est mélangée avec la phase organique, décantée et séparée.

La phase organique obtenue est mise en contact avec 750 g d'alumine, filtrée, concentrée jusqu'à un volume de 4 litres environ et reprise par 5 volumes d'hexane. Le précipité obtenu est filtré et séché. On obtient 300 g de produit que l'on met en suspension dans 1 litre d'isopropanol. Après agitation à 55°C pendant 45 minutes, on filtre à 4°C. Les eaux-mères de filtration sont concentrées à sec, reprises par 500 cm³ de méthylisobutylcétone sur lesquels on verse 5 volumes d'hexane. Le précipité est filtré, lavé à l'hexane et séché à 40°C sous pression réduite. On obtient 69 g de PIIB brute contenant 36 % de PIIB, 6 % de PIIA et ne contenant plus de PIA.

Exemple Y

60 g de PIIB brute obtenue comme précédemment à l'exemple P sont purifiés en plusieurs opérations, par chromatographie sur colonne de Nucléosil 5C8[®] (diamètre de la colonne 5 cm, hauteur 30 cm) percolée par un éluant eau/acétonitrile 60/40. On obtient ainsi 250 mg de pristinamycine IIF (PIIF).

La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques utilisables en médecine humaine ou vétérinaire qui contiennent comme produit actif la nouvelle association purifiée de streptogramine comprenant au moins une composante du groupe B des streptogramines définie par la formule générale (I) cocrystallisée avec au moins une composante du groupe A de formule générale (II), à l'état pur ou en présence d'un ou plusieurs diluants ou adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables. Ces compositions peuvent être utilisées par voie orale ou topique.

ou des granules. Dans ces compositions, le produit actif selon l'invention peut être mélangé à un ou plusieurs diluants ou adjuvants inertes, tels que saccharose, lactose ou amidon. Ces compositions

peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un lubrifiant tel que le stéarate de magnésium.

Les compositions pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes, des pommades, ou des lotions.

- 5 En thérapeutique humaine ou vétérinaire, les compositions selon l'invention sont particulièrement utiles dans le traitement des infections d'origine bactérienne notamment les infections graves à cocci Gram-positif : infections à staphylocoques (notamment les infections à staphylocoque résistant à la méthicilline), infections à streptocoques (notamment sur les pneumocoques résistants à la pénicilline et aux macrolides) ; ils sont aussi particulièrement utiles dans le traitement des infections à *Hemophilus*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*.
- 10
- 15 Les compositions selon l'invention peuvent être employées notamment dans le traitement des infections respiratoires hautes et basses (par exemple traitement des infections pulmonaires), dans le traitement des infections cutanées, dans le traitement à long terme des infections osseuses ou articulaires, dans le traitement ou la prophylaxie de l'endocardite en chirurgie dentaire et urinaire, dans le traitement des maladies sexuellement transmissibles, ainsi que dans le traitement des infections opportunistes bactériennes et parasitaires survenant dans le SIDA et en prophylaxie du risque staphylococcique chez l'immunodéprimé.
- 20
- 25 D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie qu'il estime la plus appropriée en fonction de l'âge, du poids, du degré de l'infection et des autres facteurs propres au sujet à traiter. Généralement, les doses sont comprises entre 0,4 et 2,5 g de produit

Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, illustrent des compositions selon l'invention :

Exemple A

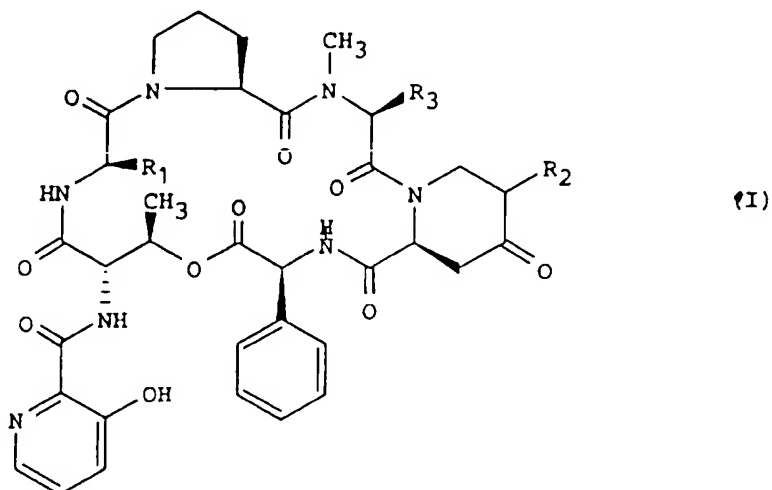
On prépare selon les techniques habituelles des gélules opaques dosées à 250 mg de l'association cocristallisée 4ε-chloro pristinamycine I_A/pristinamycine IIB.

5 Exemple B

On prépare selon les techniques habituelles des gélules opaques dosées à 250 mg de l'association cocristallisée dés(4ξ-diméthylamino) 4ε-méthoxy pristinamycine I_A/pristinamycine IIB.

REVENDICATIONS

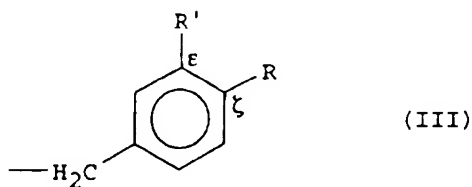
1 - Une forme purifiée de streptogramines caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une composante du groupe B des streptogramines définie par la formule générale :



5

dans laquelle

- le symbole R_1 représente un radical méthyle ou éthyle,
- le symbole R_2 représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy, et
- 10 - le symbole R_3 représente un radical benzyle substitué de formule générale :



dans laquelle

où R_1 et R_2 sont des radicaux méthyle ou éthyle, R_3 est un atome d'hydrogène ou un radical méthyle et l'autre un radical méthyle et R' est un atome de chlore ou de brome, ou représente un radical alcényle

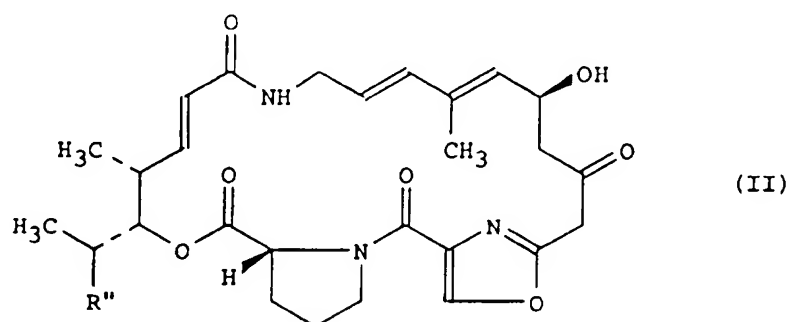
contenant 3 à 5 atomes de carbone si R_4 et R_5 sont des radicaux méthyle, ou bien

2) R est un atome d'hydrogène et R' représente un atome d'halogène, un radical alcoylamino ou dialcoylamino, le reste d'un éther-oxyde, un radical alcoylthio, alcoyle contenant 1 à 3 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou trihalogénométhyle, ou bien

R est un atome d'halogène, un radical alcoylamino contenant 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, dialcoylamino dont les parties alcoyle sont identiques ou différentes et contiennent 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou méthyl éthyl amino, un radical pyrrolidino, un radical alcényl alcoyl amino dont la partie alcényle contient 3 ou 4 atomes de carbone et la partie alcoyle est définie comme ci-dessus, un radical dialcénylamino dont les parties alcényle sont définies comme ci-dessus, un radical alcoyl cycloalcoylméthyl amino dont la partie alcoyle est définie comme ci-dessus et la partie cycloalcoyle contient 3 ou 4 atomes de carbone, le reste d'un éther-oxyde, un radical alcoylthio, un radical alcoylthiométhyle, alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, aryle ou trihalogénométhyle, et R' est un atome d'hydrogène, ou bien

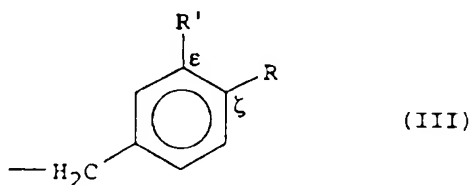
R est un atome d'halogène, un radical amino, alcoylamino ou dialcoylamino, le reste d'un éther-oxyde, un radical alcoylthio, alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou trihalogénométhyle et R' représente un atome d'halogène, un radical alcoylamino ou dialcoylamino, le reste d'un éther-oxyde ou un radical alcoylthio ou alcoyle contenant 1 à 3 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée,

co-cristallisée avec au moins une composante "minoritaire" du groupe A



dans laquelle R'' est un atome d'hydrogène ou un radical méthyle ou éthyle, étant entendu que, sauf mention spéciale, les radicaux alcoyle sont droits ou ramifiés et contiennent 1 à 4 atomes de carbone.

- 2 - Une forme purifiée de streptogramines selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une composante du groupe B des streptogramines définie par la formule générale (I) dans la revendication 1, dans laquelle :
- 10 les symboles R₁ et R₂ sont définis comme dans la revendication 1, et
- le symbole R₃ représente un radical benzyle substitué de formule générale :



dans laquelle

- 15 1) à condition que R₂ soit simultanément hydrogène, R représente NR₄R₅ pour lequel les symboles R₄ et R₅ sont l'un un atome d'hydrogène ou un radical méthyle et l'autre un radical méthyle et R'

2) méthyle, ou bien

2) R est un atome d'hydrogène et R' représente un radical alcoylamino ou dialcoylamino, le reste d'un éther-oxyde ou un radical alcoylthio, ou bien

R est un radical alcoylamino contenant 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, dialcoylamino dont les parties alcoyle sont identiques ou différentes et contiennent 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou méthyl éthyl amino, un radical pyrrolidino, un radical alcényl alcoyl amino dont la partie alcényle contient 3 ou 4 atomes de carbone et la partie alcoyle est définie comme ci-dessus, le reste d'un éther-oxyde, un radical alcoylthio, alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou trihalogénométhyle, et R' est un atome d'hydrogène, ou bien

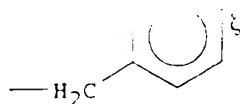
R est un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée et R' représente un atome d'halogène,

cocristallisée avec au moins une composante "minoritaire" du groupe A des streptogramines telle que définie dans la revendication 1, étant entendu que, sauf mention spéciale, les radicaux alcoyle sont droits ou ramifiés et contiennent 1 à 4 atomes de carbone.

3 - Une forme purifiée de streptogramines selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une composante du groupe B des streptogramines définie par la formule générale (I) dans la revendication 1, dans laquelle :

le symbole R₁ est un radical éthyle, le symbole R₂ est un atome d'hydrogène, et

le symbole R₃ représente un radical benzyle substitué de formule



(III)

dans laquelle

- 1) à condition que R_2 soit simultanément hydrogène, R représente NR_4R_5 pour lequel les symboles R_4 et R_5 sont l'un un atome d'hydrogène ou un radical méthyle et l'autre un radical méthyle et R' est un atome de chlore ou de brome, ou représente un radical allyle si R_4 et R_5 sont des radicaux méthyle, ou bien
- 2) R est un atome d'hydrogène et R' représente un radical alcoylamino ou dialcoylamino, un radical méthoxy, éthoxy, allyloxy ou trifluorométhoxy, ou un radical alcoylthio, ou bien
- 10 R est un radical alcoylamino contenant 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, dialcoylamino dont les parties alcoyle sont identiques ou différentes et contiennent 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou méthyl éthyl amino, un radical pyrrolidino, un radical allyl alcoyl amino dont la partie alcoyle est
- 15 définie comme ci-dessus, un radical méthoxy, éthoxy, allyloxy ou trifluorométhoxy, un radical alcoylthio, alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée ou trifluorométhyle, et R' est un atome d'hydrogène, ou bien
- R est un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée et R' représente un atome d'halogène,
- 20 cocrystallisée avec au moins une composante "minoritaire" du groupe A des streptogramines telle que définie dans la revendication 1, étant entendu que, sauf mention spéciale, les radicaux alcoyle sont droits ou ramifiés et contiennent 1 à 4 atomes de carbone.
- 25 4 - Une forme purifiée de streptogramines selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un composé
- 30 ambivalent composé d'une composante "majoritaire" du groupe A des streptogramines telles que définies dans la revendication 1, dans un rapport molaire de l'ordre de 1/2.

5 - Un procédé de préparation d'une forme purifiée de streptogramines selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on cocristallise la(les) composante(s) du groupe A des streptogramines, avec la(les) composantes du groupe B des streptogramines telles que définies dans les revendications 1 à 3.

6 - Une composante purifiée du groupe A des streptogramines telle que définie dans la revendication 1, lorsqu'elle est obtenue par l'intermédiaire d'un composé cocristallisé selon la revendication 1 à 4.

10 7 - Utilisation d'une ou plusieurs composantes minoritaires du groupe A des streptogramines telles que définies dans la revendication 1, pour la préparation de cocristallisats avec une ou plusieurs composantes du groupe B des streptogramines définies dans la revendication 1 à 3.

15 8 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une forme purifiée de streptogramines selon l'une des revendications 1 à 4, à l'état pur ou en présence de tout diluant ou adjuvant compatible et pharmaceutiquement acceptable.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/FR 95/01026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K5/078 C07K7/06 A61K38/05 A61K38/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP,A,0 614 910 (RHONE-POULENC RORER SA) 14 September 1994 see claims; examples ---	1-8
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 7, 13 February 1989 Columbus, Ohio, US; abstract no. 56082, page 551; column r; see abstract & BULLETIN DES SOCIÉTÉ CHIMIQUE BELGES, vol. 97, no. 3, pages 185-192, N.K. SHARMA ET AL. 'Isolation of factor A (virginamycin M1) and factor B (mixture of VS1 and VS4) from a commercial feed additive formulation' --- -/-	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

document published prior to the international filing date or after the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being a part of the state of the art

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 1995

Date of mailing of the international search report

17. 10. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5813 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Ex. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/FR 95/01026

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BULLETIN DE LA SOCIETE CHIMIQUE DE FRANCE, vol. 2, pages 585-591, J. PREUD'HOMME ET AL. 'Pristinamycine isolement, caracterisation et identification des constituants' cited in the application see page 585, right column, paragraph 1 - paragraph 4; tables III,IV,VI ---	1-8
A	EP,A,0 506 561 (RHONE POULENC RORER SA) 30 September 1992 see claims; examples -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No

PCT/FR 95/01026

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0614910	14-09-94	FR-A- 2701709	26-08-94
		AU-B- 5510094	25-08-94
		BE-A- 1006554	11-10-94
		CA-A- 2115807	18-08-94
		CZ-A- 9400326	14-09-94
		FI-A- 940717	18-08-94
		GB-A- 2275269	24-08-94
		GR-A- 94100078	31-10-94
		HU-A- 66821	30-01-95
		JP-A- 6298664	25-10-94
		LU-A- 88454	01-12-94
		NO-A- 940533	18-08-94
		PL-A- 302250	22-08-94
		PT-A- 101460	30-09-94
EP-A-0506561	30-09-92	FR-A- 2674539	02-10-92
		AU-A- 1552192	02-11-92
		EP-A- 0577705	12-01-94
		WO-A- 9217491	15-10-92
		JP-T- 6506350	21-07-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/01026

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C07K5/078 C07K7/06 A61K38/05 A61K38/08		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	EP,A,0 614 910 (RHONE POULENC RORER SA) 14 Septembre 1994 voir revendications; exemples ---	1-8
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 7, 13 Février 1989 Columbus, Ohio, US; abstract no. 56082, page 551; colonne r; voir abrégé & BULLETIN DES SOCIETE CHIMIQUE BELGES, vol. 97, no. 3, pages 185-192, N.K. SHARMA ET AL. 'Isolation of factor A (virginamycin M1) and factor B (mixture of VS1 and VS4) from a commercial feed additive formulation' --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	1-8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition, à un autre moyen</p> <p>document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, et que l'ensemble des documents est pertinent pour une personne du métier</p> <p>document qui fait partie d'une même activité inventive</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
5 Octobre 1995		17. 10. 95
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 60 01 Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/01026

C.(rule) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BULLETIN DE LA SOCIETE CHIMIQUE DE FRANCE, vol. 2, pages 585-591, J. PREUD'HOMME ET AL. 'Pristinamycine isolement, caractérisation et identification des constituants' cité dans la demande voir page 585, colonne de droite, alinéa 1 - alinéa 4; tableaux III,IV,VI ---</p>	1-8
A	<p>EP,A,0 506 561 (RHONE POULENC RORER SA) 30 Septembre 1992 voir revendications; exemples -----</p>	1-8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 95/01026

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0614910	14-09-94	FR-A- 2701709	26-08-94
		AU-B- 5510094	25-08-94
		BE-A- 1006554	11-10-94
		CA-A- 2115807	18-08-94
		CZ-A- 9400326	14-09-94
		FI-A- 940717	18-08-94
		GB-A- 2275269	24-08-94
		GR-A- 94100078	31-10-94
		HU-A- 66821	30-01-95
		JP-A- 6298664	25-10-94
		LU-A- 88454	01-12-94
		NO-A- 940533	18-08-94
		PL-A- 302250	22-08-94
		PT-A- 101460	30-09-94
EP-A-0506561	30-09-92	FR-A- 2674539	02-10-92
		AU-A- 1552192	02-11-92
		EP-A- 0577705	12-01-94
		WO-A- 9217491	15-10-92
		JP-T- 6506350	21-07-94